

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Pectinasas en la autólisis de los hongos fitopatógenos :
estudio especial en alternaria alternata**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Covadonga Vázquez Estévez

DIRECTOR:

Fuensanta Reyes Ramírez

Madrid, 2015



5310033684

pec

COVADONGA VAZQUEZ ESTEVEZ

PECTINASAS EN LA AUTOLISIS DE HONGOS FITOPATOGENOS.
ESTUDIO ESPECIAL EN *Alternaria alternata*.



Director: Dr. Fuensanta Reyes Ramírez
Instituto "Jaime Ferrán"
de Microbiología.

^{u B}

Departamento de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

1984

R. 27.188

VºBº

Quiero expresar mi agradecimiento al Centro de Investigaciones Biológicas y especialmente al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C.S.I.C. donde se ha realizado este trabajo.

Así mismo agradezco al Profesor Dr. D. Carlos Vicente Cordoba el haber asumido la ponencia de esta investigación.

Al Dr.D.Rafael Lahoz Oliver como Director de la Unidad "Fisiología y Bioquímica de Hongos" mi gratitud por los medios puestos a mi disposición y su constante apoyo.

Quiero manifestar sobre todo mi especial agradecimiento a la Dr. Dña. Fuensanta Reyes Ramírez cuyo inestimable esfuerzo y dedicación en la dirección de este trabajo lo han hecho posible.

A todos los compañeros del Laboratorio, especialmente a la Dra. Ma Jesús Martínez y a Ma Teresa Raposo por su ayuda desinteresada en todo momento, y a los Dres. Ma Teresa Serra y Angel Martínez por su importante ayuda y estímulo.

INDICE

I- INTRODUCCION	1
II-MATERIALES Y METODOS.....	19
II.1.- Microorganismos utilizados en este estudio.	20
II.2.- Procedencia de los microorganismos....	24
II.3.- Mantenimiento de los microorganismos..	24
II.4.- Preparación de inóculos.....	25
II.5.- Medios de cultivo.....	25
II.5-1.- Agar-patata.....	25
II.5-2.- Czapek-Dox.....	25
II.6.- Método de toma de muestra.....	27
II.7.- Determinación de azúcares reductores..	28
II.8.- Determinación de proteínas.....	33
II.9.- Soluciones tampón utilizadas.....	37
II.9-1.- Tampón citrato-fosfato-borato	37
II.9-2.- Tampón de McIlvaine.....	37
II.9-3.- Tampón de Clark y Lubs.....	38
II.9-4.- Tampón de fosfato de Sorensen	38
II.10.- Valoración de las actividades enzimáticas en el líquido de cultivo.....	40
II.10-1.- Actividad Exo-1,3-B-glucanasa.....	40
II.10-2.- Actividad Endo-1,3(4)-B-glucanasa.....	41
II.10-3.- Actividad 1,6-B-glucanasa...	42
II.10-4.- Actividad Celulasa.....	42
II.10-5.- Actividad -amilasa.....	43
II.10-6.- Actividad Invertasa.....	44
II.10-7.- Actividad Dextranasa.....	45

II.10-8.- Actividad Fosfatasa.....	45
II.10-9.- Actividad Quitinasa.....	47
II.10-10.-Actividad Galacturonasa.....	55
II.10-10-a.- Poligalacturonasa.	55
II.10-10-b.- Polimetilgalactu- ronasa.....	58
II.10-11.- Actividad Pectinliasa.....	58
II.10-12.- Actividad Pectatoliasa.....	59
II.10-13.- Actividad Endo(pectina).....	60
II.10-14.- Actividad Endo(ác. poligalac.)	61
II.11.- Metodo para diferenciar actividades hidrolíticas y liásicas.....	63
II.12.- Precipitación de proteínas.....	65
II.13.- Cálculo del grado de autólisis.....	66
II.14.- Determinación de las características cinéticas.....	67
II.14-1.- pH óptimo.....	67
II.14-2.- Variación de la actividad con la concentración de en- zima.....	67
II.14-3.- Determinación de la constan <u>t</u> te de Michaelis-Menten y ve locidad máxima.....	68
II.15.- Cromatografía en papel.....	69
II.16.- Filtración en gel.....	71
II.16-1.- Filtración en Sephadex.....	71
II.16-2.- Filtración en Bio-Gel-P ₂ ...	74
II.17.- Electroenfoque.....	75

II.18.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	77
II.18-1.- Electroforesis en acrilamida- pectina.....	81
II.19.- Maceración de tejidos.....	82
II.20.- Obtención de protoplastos.....	90
III- RESULTADOS.....	92
III.1.- Parámetros estudiados en las muestras..	93
III.2.- Resultados obtenidos en <u>Mucor rouxii</u> ...	93
III.3.- Resultados obtenidos en <u>Rhizopus stolo-</u> <u>nifer</u>	94
III.4.- Resultados obtenidos en <u>Rhizopus arrhi-</u> <u>zus</u>	95
III.5.- Resultados obtenidos en <u>Cunninghamella</u> <u>elegans</u>	96
III.6.- Resultados obtenidos en <u>Cunninghamella</u> <u>echinulata</u>	97
III.7.- Resultados obtenidos en <u>Trichoderma vi-</u> <u>ride</u>	98
III.8.- Resultados obtenidos en <u>Fusarium oxys-</u> <u>porum</u>	98
III.9.- Resultados obtenidos en <u>Fusarium culmo-</u> <u>rum</u>	99
III.10.- Resultados obtenidos en <u>Cladosporium</u> <u>herbarum</u>	100
III.11.- Resultados obtenidos en <u>Cladosporium</u> <u>cucumerinum</u>	100
III.12.- Resultados obtenidos en <u>Helminthospo-</u> <u>rium halodes</u>	101
III.13.- Resultados obtenidos en <u>Alternaria al-</u> <u>ternata</u>	102

III.14.- Elección del hongo <i>Alternaria alternata</i> ...	117
III.15.- Inducción de enzimas p _p écticas en la auto- lisis de <u>A.alternata</u>	117
III.16.- Parámetros estudiados en las muestras de <u>A.alternata</u> en cultivos con pectina.....	118
III.17.- Presencia de actividad hidrolítica y liási- ca en el complejo enzimático.....	130
III.18.- Presencia de ácido galacturónico en las pa- redes y líquido de cultivos de <u>A.alternata</u>	132
III.19.- Características cinéticas	134
III.19-1.- Poligalacturonasa.....	134
III.19-2.- Polimetilgalacturonasa.....	139
III.19-3.- Pectatoliasa.....	146
III.19-4.- Pectinliasa.....	152
III.19-5.- Endo- ác.poligalacturónico.....	159
III.19-6.- Endo- pectina.....	165
III.20.- Propiedades físicas de complejo enzimático	173
III.20-1.- Filtración en Sephadex G-200...	173
III.20-2.- Determinación del punto isoele _c - trico.....	179
III.20-3.- Electroforesis en geles de poli- acrilamida.....	183
III.21.- Productos de reacción del complejo enzimá- tico sobre los sustratos.....	192
III.22.- Maceración de tejidos.....	195
III.23.- Obtención de protoplastos.....	204
IV- DISCUSION.....	213
V- CONCLUSIONES.....	234
VI- BIBLIOGRAFIA.....	236

I.- INTRODUCCION

Los hongos abarcan una desconcertante colección de formas y clases de organismos por lo cual es difícil una definición simple y concreta.

Poseen 5 características principales: Son eucariotas, heterótrofos, carecen de clorofila, toman su alimento al absorberlo del medio que les rodea y son básicamente multinucleados. Las tres primeras características se encuentran en todos los animales y algunas plantas y las otras dos no se encuentran normalmente en organismos eucariotas.

El hecho de que posean más de un núcleo en un citoplasma común junto con una gran flexibilidad de aclopamientos somáticos es la base de su gran variedad y supervivencia sobre cualquier sustrato y en cualquier condición ambiental sobre la Tierra.

En la naturaleza los hongos juegan un papel importante en la descomposición de la materia orgánica y son responsables junto a las bacterias del reciclaje del C, N y otros elementos vitales; pero las enfermedades causadas por los hongos tanto en plantas, como en animales y en el hombre tienen tanta repercusión que pueden afectar al bienestar y supervivencia de la humanidad. Por otra parte poseen un gran valor económico, debido a la gran cantidad de metabolitos que pueden sintetizar como alcoholes, antibióticos, enzimas, ácidos orgánicos etc. Se utilizan en gran cantidad de fermentaciones industriales, en la fabricación de quesos, envejecimiento de carnes, alimentos preparados a partir de micelio,

etc., Finalmente los hongos tienen en la actualidad una gran importancia en la Biología experimental, con la ventaja de que al ser organismos eucariotas los resultados obtenidos en los trabajos de investigación pueden ser extrapolados con más éxito a otros sistemas eucariotas.

Viven como saprófitos, parásitos o asociados con otros organismos simbióticamente.

Los hongos filamentosos o mohos, en su estado vegetativo están formados por filamentos microscópicos llamados hifas, que constantemente se desarrollan por crecimiento apical o ramificaciones laterales mientras haya alimento que absorben por toda la superficie de la hifa. La masa de hifas constituye el talo del hongo llamado micelio. Según el tipo de hongo el citoplasma puede ser continuo a lo largo de la hifa, o estar interrumpido por una pared transversal llamada septo que deja pasar a su través las sustancias citoplasmáticas.

Los hongos filamentosos poseen núcleos con membrana nuclear, nucleolos y cromosomas. La presencia de una pared celular rígida determina en gran parte la forma de los hongos filamentosos y se ha considerado que el desarrollo morfológico de los hongos puede ser reducido a una cuestión de morfogénesis de la pared celular (Bartnicki-García, 1968). La pared celular es una estructura dinámica y compleja, lugar de actividad de diversas enzimas y está formada por molé

culas estructurales de quitina y celulosa junto con otros muchos polisacáridos y cantidades específicas de proteínas y lípidos. La reproducción asexual y sexual tiene lugar generalmente después de una fase de crecimiento vegetativo rápido.

La cinética del crecimiento de microorganismos presenta las siguientes fases bien definidas, Mandels (1965) las recoge en una curva ideal para microorganismos unicelulares en el libro "The Fungi", y que aplica con limitaciones al crecimiento de hongos filamentosos:

- 1º.- Fase de latencia o adaptación al medio.
- 2º.- Fase de aceleración o iniciación de la división celular.
- 3º.- Fase exponencial o logarítmica, con velocidad uniforme de crecimiento.
- 4º.- Fase de desaceleración o decrecimiento de la división celular.
- 5º.- Fase estacionaria, en la cual cesa la división celular.
- 6º.- Fase de decadencia o autólisis, con un decrecimiento de las células viables.

La fase de decadencia o autólisis sobreviene como

una consecuencia lógica de la muerte de la célula al faltar los nutrientes del medio, principalmente la fuente de carbono. El hongo en esta fase degrada primeramente sus sustancias de reserva y después tiene lugar una degradación tanto del citoplasma como de la pared celular, produciendo los elementos necesarios para su supervivencia. La autólisis tiene lugar por las enzimas líticas que el hongo tiene o sintetiza para llevar a cabo este proceso degradativo con la cooperación de procesos químicos y físicos.

Debido a que los procesos degradativos de los hongos filamentosos son los que menos atención han recibido por parte de los investigadores, la fisiología y bioquímica de la autólisis así como las implicaciones que esta fase del crecimiento pueda tener tanto en los procesos de patogenicidad como en la obtención industrial de metabolitos y en especial enzimas líticas, están siendo objeto de nuestro estudio.

Según Matile (1969), la autólisis puede ser considerada como la muerte de la célula. Al agotarse los nutrientes del medio, los lisosomas, cuerpos donde están confinadas las enzimas líticas y tienen lugar los procesos líticos celulares, no pueden seguir regenerando su membrana lisosomal, ésta se rompe y libera al citoplasma y al medio su contenido enzimático, empezando así la autólisis incontrolada del material citoplasmático y paredes celulares, con la consiguiente pérdida de peso seco de micelio, mucho mayor en los primeros

días de la autólisis.

Fencel(1978), consideró que la principal causa de la autólisis es, aparentemente, la pérdida del balance material existente en la hifa del hongo, causado por factores internos o externos, a los que contribuyen de manera especial la falta de nutrientes, especialmente la de fuentes de energía; la falta de éstas puede ser causada por agotamiento de las mismas o por una deficiencia específica en una hifa debido a su localización, por lo que se encuentran en general hifas autolizadas en cultivos en crecimiento.

Trinci y Righelato (1970) llegaron a la conclusión de que un cultivo de hongos es citológicamente heterogéneo en cualquier estado de su desarrollo, y la edad de un cultivo no puede ser usada como un indicador de los cambios morfológicos.

El agotamiento de nutrientes en el medio determina que un cultivo empiece a autolizarse gradualmente, produciéndose un reciclaje de los productos metabólicos de la degradación, por lo que la autólisis puede ser considerada como un camino de supervivencia en condiciones de inanición.

Entre los primeros estudios sobre la autólisis de hongos filamentosos están los de Ritter (1912), Dox y Maynard (1912), Dox (1913) y Brenner (1914), que describieron fenómenos visibles de degradación en cultivos de hongos, una vez agotada la fuente de carbono del medio, como son la

pérdida de turgencia, variaciones en la consistencia del micelio, distintas coloraciones en el líquido de cultivo y en el micelio, etc.

Brown (1923), considera que la autólisis tiene lugar como una consecuencia de la acumulación de metabolitos de naturaleza tóxica. Boyle (1924), intentó poner de mani-fierto en especies de Fusarium , si el envejecimiento de este hongo es de origen enzimático, pero no obtuvo resulta-dos concluyentes.

Los trabajos de Clara Pratt(1924) son interesantes, ya que es la primera investigación en la que se sigue el en-vejecimiento de cultivos en especies de Fusarium determinan-do químicamente la liberación de metabolitos (azúcares, amo-níaco, ácidos orgánicos, etc.), además llega a la conclusión de que la falta de nutrientes del medio por agotamiento de éstos y la acumulación de productos metabólicos, son dos factores de igual importancia en el proceso degradativo.

Siguiendo cronológicamente los trabajos sobre la autólisis nos encontramos en 1930 con los de Behr sobre la autólisis de Aspergillus niger en diferentes condiciones de cultivo; estudió el proceso autolítico como pérdida de peso seco de micelio y solubilización del nitrógeno celular, en-contró que la autólisis era mucho más rápida en medio fisio-lógicamente alcalino , pH 6,7 y NO_3Na como fuente de N, que en medio ácido, pH 1 y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ como fuente de N.

Rippel y Behr (1930), estudiaron la liberación del magnesio durante la autólisis de A.niger; en 1936, estos mismos autores, siguieron la liberación de compuestos de azufre durante la autólisis de éste microorganismo.

Hockenhull (1946,1950) y Raistrick (1948), también estudiaron la liberación de compuestos de azufre durante el proceso degradativo.

Paralelamente aparecen trabajos sobre la liberación de compuestos orgánicos que contienen fósforo, Michel-Durand (1938), Chang (1940) y Semenik (1944). Estos dos últimos autores llegan a opinar que la autólisis viene marcada por la aparición de fosfatos en el medio.

Los primeros trabajos sobre la autólisis se centran más sobre la liberación de ciertas sustancias y elementos al medio de cultivo. A partir de los años 50 los estudios sobre la autólisis, investigan tanto la degradación del citoplasma como la de la pared celular del hongo, encontrándose principalmente trabajos sobre degradación autolítica de hidratos de carbono, de proteínas, de grasas, de ácidos nucleicos y de paredes celulares.

Los hidratos de carbono son ante todo los suministradores de energía en el metabolismo celular, se encuentran en la pared celular como constituyentes y en el citoplasma como sustancias de reserva. Estos compuestos pueden pasar al medio como monosacáridos y oligosacáridos, (Tandon y Chandra

(1962); Emiliani y Ucha de Davis (1962), Arima y col. (1965) Lahoz y col. (1967, 1970 y 1971)), y pueden metabolizarse de nuevo por el hongo en el reciclaje o "turnover" de sustancias.

Trinci y Righelato (1970), pudieron comprobar en cultivos quimiostáticos de Penicillium que la degradación de los hidratos de carbono en el micelio tenía lugar al cabo de dos días de defecto de glucosa, mientras que Baindringe y col. (1971), encontraron una rápida disminución de los hidratos de carbono del micelio al interrumpir el suministro de glucosa.

En la autólisis de Botrytis cinerea Martínez y col. (1982), encuentran que las sustancias reductoras libres existentes tanto en el líquido de cultivo como, en los extractos de micelio, disminuyen progresivamente hasta agotarse en el proceso degradativo.

La degradación autolítica de las proteínas transcurre pasando por los polipéptidos, péptidos de bajo peso molecular hasta aminoácidos. Entre los trabajos más interesantes en este campo, podemos citar los de Behr (1930), Foster (1949), Ritter (1955), Emiliani y Perera (1958), Emiliani y De Davis (1962), Tandon y Chandra (1962), Uozumi y col. (1965), Lahoz y col. (1966), Paul (1970), Bainbridge y col. (1971), y Bilai y col. (1972).

Behr (1930), encontró durante la autólisis de hongos filamentosos en medio ácido, muchos compuestos orgáni-

cos nitrogenados y poco amoníaco; por el contrario durante la autólisis a pH alcalino, encontró menos péptidos y aminoácidos y más amoníaco.

Ritter (1955), destacó también diferencias en la concentración de amoníaco en el medio según la autólisis transcurriera a diferentes pH. Existen pocos datos sobre la cesión de proteínas al medio durante la autólisis. Por lo general parece que en tanto no se destruya la pared celular se liberan pocas proteínas en la autólisis de hongos filamentosos (Emiliani y Parera (1958), Emiliani y De Davis (1962) Uozumi y col. (1965) y Bilai y col. (1972)). La liberación de aminoácidos ha sido confirmada por diversos investigadores y también la desaminación de los mismos, Tandon y Chandra (1962) encontraron 18 aminoácidos libres en el micelio de Colletotrichum gloeosporioides. Recientemente, se ha comprobado en Neurospora crassa Reyes y col. (1981) que durante el proceso degradativo no solamente hay secreción de proteínas ya existentes al medio, sino que también hay proteínas de nueva síntesis, que ha tenido lugar en el proceso degradativo. Entre estas proteínas de nueva síntesis se han encontrado enzimas líticas capaces de llevar a cabo la degradación de la pared celular de N. crassa como son 1,3- β glucanasa y β -N-acetilglucosaminidasa.

La degradación autolítica de los ácidos nucleicos abarca los polinucleótidos, nucleótidos, nucleósidos, bases,

ribosa y dexosiribosa. Nakao y col (1964), encontraron que en especies de Aspergillus la hidrólisis tiene lugar por nucleasas. Arima y col. (1965) comprobaron la cesión de componentes de los ácidos nucleicos al medio. Lahoz y col.(1969) consideran el incremento del ortofosfato en el medio como un índice de la degradación autolítica de los ácidos nucleicos, Nagasaki (1968) determinó las variaciones en las actividades nucleásicas en micelios envejecidos de A.niger. Trinci y Righelato (1970) y Bainbridge y col. (1971) confirman en Penicillium chrysogenum y A.niger respectivamente, la degradación de ácidos nucleicos durante la autolisis.

Los lípidos se degradan continuamente en el micelio durante la autolisis. Las especies de Aspergillus pierden hasta un 75%, (Lahoz y col. (1967,1968,1970)), y Nectria galligena pierde hasta un 87% de la concentración preautolítica de lípidos miceliare. También encuentran éstos autores en A.niger una dependencia entre la pérdida de lípidos y la concentración inicial de glucosa en el medio. Según Gunasekaban y col. (1973), el contenido de lípidos de Pyrenochaeta decrece más rápidamente que el peso seco del micelio.

El estudio de la degradación de la pared celular ha sido sin duda uno de los campos donde más se ha trabajado en la autolisis.

Las paredes celulares de los hongos filamentosos están constituidas por glucanos, proteínas y quitina(Bart-

nicki-García (1968), Hunsley y Burnett (1970), Janszen y Wessels (1970)) que forman capas concéntricas , con una capa interna de quitina y capas externas de glucano(Burnett(1979)). En relación con esta estructura, la autólisis de la pared celular, tiene que producirse mediante diferentes enzimas líticas capaces de degradar los distintos componentes de la pared actuando cooperativamente(Villanueva,1966).

La importancia de las glucanasas en este proceso degradativo ha sido ampliamente demostrada,(Wessels, (1966, 1969,1971), Wessels y Niederpruem (1967), Wessels y De Vries (1973), Zonneveld (1971,1972)) así como la acción estimulante de las glucanasas sobre la degradación de la quitina por quitinasas, ya que parece que parte de la quitina de la pared puede estar incluida en una matriz de glucano,(Wessels y Marchant (1974), Michalenko y col. (1976)).

Según Polachek y Rosenberger (1975), las paredes celulares de A.nidulans se autolizan con las enzimas que retienen en un 3%, liberando al medio monosacáridos, oligosacáridos, N-acetilglucosamina y aminoácidos. El grado de lisis fue mayor en paredes más jóvenes. Las paredes más viejas adquieren resistencia a la autólisis (Iten y Matile (1970)). Kuo y Alexander (1967) encontraron un incremento en la resistencia a la lisis de A.nidulans relacionado con el contenido en melanina.

En contraposición con los autores anteriormente ci

tados que encontraron que había una degradación autolítica de la pared, otros autores no han podido confirmar una degradación significativa de la pared celular durante la autólisis; entre ellos podemos citar Arima y col. (1965) y Uozumi y col. (1965) para Aspergillus oryzae; Trinci y Righelato (1970) para Penicillium; Bainbridge (1971) para Aspergillus niger y Hofsten y Hofsten (1974) para Sporotricum pulverulentum.

Reyes y Lahoz (1977), encontraron que las paredes celulares de Sclerotinia fructigena se autolizaban en un 10% con sus propias enzimas retenidas en la pared y en un 50% agregándole enzimas líticas obtenidas de cultivos autolizados del propio hongo. Recientemente Pérez-Leblic y col. (1982), han confirmado la lisis de la pared celular de otras especies de hongos con sus propias enzimas líticas, obtenidas para cada hongo de sus propios cultivos autolizados; Obteniéndose en el caso de Penicillium oxalicum lisis hasta de un 94% en paredes jóvenes.

Durante el proceso degradativo o autólisis de hongos filamentosos hay, en el líquido de cultivo, acumulación de enzimas líticas capaces de llevar a cabo la degradación de la propia pared celular; Estas enzimas provienen de las ya existentes en el micelio o son sintetizadas de nuevo durante el proceso degradativo (Reyes y col., 1981).

El conocimiento de los mecanismos que regulan la

síntesis de las enzimas que degradan la pared celular es esencial para la interpretación del proceso autolítico. Probablemente los inductores de la síntesis de éstas enzimas son los propios polisacáridos existentes en la pared celular de cada hongo o los monómeros u oligómeros producidos en la lisis de dicha pared y mantenidos en el líquido de cultivo a los bajos niveles requeridos para la inducción (Reese, 1977), debido al reciclaje de sustancias que tiene lugar durante la autólisis.

La gran acumulación de enzimas líticas que durante la autólisis tiene lugar en hongos filamentosos, nos llevó a preguntarnos, si la autólisis de hongos fitopatógenos pudiera estar implicada de alguna manera en la infección de las plantas por éstos patógenos.

La degradación de los polisacáridos de las paredes celulares de las plantas por enzimas extracelulares de hongos y bacterias, es un aspecto fundamental de la patogénesis en un amplio espectro de las enfermedades de las plantas. Aun que el papel de éstas enzimas puede ser solamente secundario en términos de especificidad o inducción de los síntomas, su producción inicial o continuada puede determinar si la infección tiene lugar o no.

Por otra parte, la pared celular de las plantas es tá formada por una estructura compleja y ordenada que constituye una barrera y defiende a las células de las invasio-

nes microbianas. Tradicionalmente la pared celular de la planta se divide en tres regiones de acuerdo con su estructura y función: lámina media, pared primaria y pared secundaria. La lámina media es una región donde las paredes de las células adyacentes están en contacto. La pared primaria tiene una organización definida y es la más dinámica de las capas. La pared secundaria, es la porción de pared que se forma cuando ya ha terminado la elongación celular. De una región a otra varía, de forma gradual, tanto la composición química como el grado de organización.

Los polisacáridos de la pared han sido históricamente agrupados en sustancias pécticas, hemicelulosas y celulosas, (Northcote, 1963), basándose en la solubilidad de los polisacáridos constituyentes de la pared más bien que en su composición química. Las sustancias pécticas son los principales constituyentes de la lámina media y elementos estructurales de la pared primaria, (McCledon, 1964; Talmadge y col. 1973). Las hemicelulosas son los principales componentes de la pared primaria y secundaria y encadenan las fracciones pécticas y celulósicas, (Baner, 1973; Northcote, 1963). La celulosa es la sustancia más abundante encontrada en el reino vegetal y constituye el mayor componente estructural de las paredes. En la pared primaria las fibrillas de celulosa están orientadas al azar, la pared secundaria está formada por capas de celulosa orientadas en diferentes direcciones, (Muhle

thaler, 1967)). En las paredes de las plantas leñosas hay además un componente muy importante: la lignina.

Un comportamiento característico de muchos organismos fitopatógenos es la facultad de producir una serie de enzimas capaces de degradar los polisacáridos complejos de las paredes celulares de las plantas y los constituyentes de las membranas , (Bateman y Millar, 1966; Wood, 1967, 1973; Albersheim y col. 1969; Porter, 1966; Tseg y Bateman, 1968). Por lo general, estas enzimas se producen inductivamente, son extracelulares, muy estables y están presentes en tejidos infectados (Bateman y Basham, 1976). La capacidad de muchos hongos, patógenos de plantas, para producir éstas enzimas en cultivo, no es suficiente para adscribir a éstas un papel en la patogenicidad (Byrde, 1979). Sin embargo, el estudio "in vitro" de la secreción de enzimas puede ser una indicación del tipo de enzimas que un patógeno es capaz de producir en relación con la infección y la enfermedad.

Los resultados obtenidos en Botrytis cinerea (Martínez y col., 1982) con la producción de enzimas pécticas durante la autólisis de este hongo, sin agregar al medio ningún inductor de la síntesis de éstas enzimas, nos llevó a pensar que probablemente los hongos fitopatógenos pudieran producir durante el proceso degradativo enzimas pécticas capaces de degradar las pectinas de la pared celular de las plantas que parasitan. Con el fin de poder estudiar la posible impli

cación de la autólisis en los fenómenos de patogenicidad se ha planificado éste trabajo de la siguiente manera:

1º.- Elección de hongos fitopatógenos que por su virulencia tengan interés económico.

2º.- Estudio de la autólisis natural de cada hongo, observando las variaciones que experimentan los siguientes parámetros: pH, peso seco de micelio, grado de autólisis, sustancias reductoras y proteínas.

3º.- Estudio de la aparición y variaciones de las actividades enzimáticas: poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa en el líquido de cultivo durante la autólisis de cada hongo.

4º.- Selección del hongo cuyas actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa presenten mayor interés.

5º.- Inducción de éstas actividades enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de pectina en el medio de cultivo.

6º.- Estudio del complejo enzimático con mayor actividad péctica obtenido de cultivos autolizados.

7º.- Propiedades de las diferentes enzimas pécticas existentes en el complejo enzimático que degradan pectina y ácido poligalacturónico.

8º.- Maceración de tejidos vegetales.

9º.- Obtención de protoplastos vegetales con dicho complejo enzimático.

II.- MATERIALES Y REACTIVOS

II.1.- MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.

La ordenación sistemática de las especies estudiadas está basada en los trabajos de Domsch, 1980 y Arx, 1981.

Clase ZYGOMYCETES

Micelio cenocítico, multicelular.

Reproducción sexual por conjugación de dos células gametángicas dando lugar a una espora de resistencia de paredes gruesas, la cigospora.

Orden MUCORALES:

Esporas asexuales dentro de esporangios, que en las formas más evolucionadas pueden tener una sola espora. Especies saprofíticas.

Familia MUCORACEAE:

Esporangios multiesporados, con columela. Dos géneros hemos estudiado en esta familia.

Género Mucor : Esporangióforo ramificado simpdialmente o en ocasiones en forma racemosa, sin rizoides. La mayor parte de las especies son heterotálicas. Mucor rouxii (M. indicus)

Género Rhizopus : Esporangióforo sobre nudos con

rizoides. Heterotálico.

Rhizopus arrhizus (=R.oryzae)

Rhizopus stolonifer.

Familia CUNNINGHAMELLACEAE:

Esporangios uniesporados(esporangiolas), semejantes a conidios, sobre esporangióforos ramificados terminados en vesículas. Heterotálicos.

Género Cunninghamella: Esporangiolas espinosas

Cunninghamella elegans

C. echinulata.

Clase DEUTEROMYCETES (Hongos imperfectos)

Micelio septado y reproducción sexual desconocida. Esporas asexuales, conidios sobre hifas, conidióforos o cuerpos fructíferos pero no en esporangios.

Relacionados con las Clases Ascomycetes y Basidiomycetes.

Orden MONILIALES:

Conidiomata (picnidios o acérvulos) ausentes, es decir, conidios sobre conidióforos o micelio.

Los géneros citados a continuación están todos relacionados con los ascomicetos y concretamente con los Ordenes Sphaeriales y Dothideales, que pertenecen a dos grupos bien diferentes de ascomicetos.

Los Sphaeriales se sitúan entre los Pirenomicetos, caracterizados por la presencia de peritecios (= ascocarpos esféricos o en forma de botella provistos de un ostiolo). Mientras que los Dothideales pertenecen a los Loculoascomicetos, que forman ascostromas (estromas con lóculos ascógenos en los que se encuentran las ascas sin un tejido especializado que los separe del estroma).

Géneros relacionados con los Sphaeriales:

Género Trichoderma : Conidios producidos por fiálides, más o menos verticiladas y agrupadas en masas que dan a las colonias aspecto característico.

Trichoderma viride (constituye la forma anamórfica de 6 especies de Hypocrea , principalmente H.rufa).

Género Fusarium: Relacionado con varios géneros de Sphaeriales (Nectria, Gibberella, Calonectria, Plecphaerella). Conidios fusiformes, falcados o "lunados", producidos por fiálides verticiladas o frecuentemente agrupadas formando esporodóquios. Fusarium culmorum y F.oxysporum.

Géneros relacionados con los Dothideales:

Género Cladosporium: Conidios blásticos, en cadenas

acropétalas, ramificadas, muy lábiles, con conidios unicelulares en los ápices y tabicados en la porción basal.

Cladosporium herbarum (forma anamórfica de Mycosphaerella tassiana).

Cladosporium cucumerinum.

Género Helminthosporium: Conidios (poroconidios)

cilíndricos o elipsoidales con septos transversales.

Helminthosporium halodes (= Dreslera halodes y forma anamórfica de Setosphaeria rostrata).

Género Alternaria: Conidios (poroconidios) redondeados por la base y con el ápice alargado, con septos longitudinales y transversales.

Alternaria alternata (forma anamórfica de Clathospora diplospora, Clathospora elynae y Leptosphaeria heterospora).

II.2.- PROCEDENCIA DE LOS MICROORGANISMOS.

Los hongos estudiados pertenecían a las siguientes colecciones:

Mucor rouxii C.E.C.T. 2654 (Valencia)

Rhizopus arrhizus C.E.C.T. 2340

Rhizopus stolonifer C.E.C.T. 2672

Cunninghamella elegans C.E.C.T. 2123

Cunninghamella echinulata C.E.C.T. 2120

Trichoderma viride C.E.C.T. 2423

Fusarium oxysporum 149.25 Centraalbureau voor schim-
melcultures. Baarn

Fusarium culmorum C.E.C.T. 2148

Cladosporium herbarum C.E.C.T. 2665

Cladosporium cucumerinum C.E.C.T. 2107

Helminthosporium halodes C.E.C.T. 2667

Alternaria alternata 105.24 Centraalbureau voor
schimmelcultures, Baarn.

II.3.- MANTENIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Los hongos se mantienen mediante resiembras periódicas en tubos inclinados de Agar-patata-dextrosa, siguiendo las técnicas habituales en Microbiología. Los tubos así sembrados se incuban en estufa a 25°C durante 5 días para obte-

ner un buen crecimiento y esporulación.

II.4.- PREPARACION DE INOCULOS.

Los inóculos se preparan a partir de cultivos jóvenes, de 5 a 8 días, que han crecido a 25°C en oscuridad y el inóculo se prepara a partir de una suspensión de esporas, añadiendo 10 ml. de agua destilada estéril y raspando la superficie del cultivo con el asa de siembra.

Los matraces para la toma de muestras son inoculados con 1ml. de esta suspensión que contiene del orden de 10^6 esporas por ml.

II.5.- MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo empleados fueron:

II.5-1.- Agar-patata.

Infusión de patatas..... 200 g/l.

Glucosa..... 20 g/l.

Agar..... 20 g/l.

Estos componentes se disuelven en agua destilada y se esteriliza en autoclave por tindalización.

II.5-2.- Czapek-Dox.

Modificado por Reyes y Byrde (1973), suplementado con extracto de levadura.

Glucosa.....	10 g/l.
Tartrato amónico.....	2 g/l.
Fosfato monopotásico.....	1 g/l.
Sulfato magnésico hidratado.....	0,5 g/l.
Cloruro potásico.....	0,5 g/l.
Extracto de levadura.....	1 g/l.
Elementos traza.....	1 ml/l.
Agua destilada.....	1000 ml/l.

La solución de elementos traza tiene la siguiente composición:

$B_4O_7Na_2 \cdot 10 H_2O$	100 mg/l.
$SO_4Zn \cdot 7 H_2O$	70 mg/l.
$SO_4Fe \cdot 7 H_2O$	50 mg/l.
$SO_4Cu \cdot 5 H_2O$	10 mg/l.
$SO_4Mn \cdot 4 H_2O$	10 mg/l.
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4 H_2O$	10 mg/l.

Se disuelven las sales en agua destilada excepto el Fosfato monopotásico que se añade en último lugar para evitar precipitaciones. A esta mezcla se añade la glucosa previamente disuelta en agua destilada y la solución de elementos traza y se completa el volumen hasta 1 l. con agua destilada. Este medio se esteriliza en autoclave por tindalización (15 minutos durante tres días consecutivos a corriente de vapor).

En el medio anteriormente descrito la fuente de carbono fue sustituida por pectina, con objeto de inducir la producción de enzimas pécticas.

La pectina se agregó en concentraciones desde 0,25 hasta 1%. Los medios así obtenidos los denominamos:

	<u>PECTINA (%)</u>	<u>GLUCOSA (%)</u>
medio I	0,25	0,75
medio II	0,50	0,50
medio III	0,75	0,25
medio IV	1	0,0

La pectina se disolvió previamente por calentamiento en agua destilada. Estos medios se esterilizaron en autoclave por tindalización.

II.6.- METODO DE TOMA DE MUESTRA.

Para la toma sistemática de muestras se utilizaron matraces de 100 ml. de capacidad con 20 ml. de medio de cultivo. Una vez inoculados se incubaron en estufa, marca Selecta, a 25°C, transcurrido el tiempo necesario se procedía a la toma de muestra.

El medio de cultivo se separa del micelio por filtración a vacío.

II.7.- DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES LIBRES EN EL LIQUIDO DE CULTIVO.

La cantidad de azúcares reductores presentes en una muestra problema, se determinó según el método de Somogyi (1945) en combinación con el método de Nelson (1944).

Fundamento:

Este método se basa en la oxidación de los azúcares y sustancias reductoras mediante compuestos orgánicos cúpricos en solución alcalina.

Las sustancias reductoras son oxidadas por el sulfato cúprico, el cual se reduce a óxido de cobre que es de color rojo, que al reaccionar con el reactivo de Nelson forma un complejo de color azul. La intensidad de color depende de la cantidad de cobre reducido, o lo que es lo mismo, de la cantidad de sustancias reductoras existentes en el líquido problema. Este color se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540nm.

Reactivos:

Reactivo alcalino de Somogyi, consta de los siguientes componentes:

- a) 24 g. de carbonato sódico anhidro, más 12 g. de tartrato sódico potásico en 250 ml. de agua destilada.

- b) 4 g. de sulfato cúprico hidratado en 40 ml. de agua destilada. Esta solución se agrega agitando a la solución a.
- c) Sobre la mezcla a y b se añaden lentamente 16 g. de bicarbonato sódico.
- d) 180 g. de sulfato sódico anhidro, se disuelven en 500 ml. de agua destilada caliente, y seguidamente se hierve para expulsar el aire. Una vez enfriado, se añade la mezcla c y se completa el volumen hasta 1000 ml. con agua destilada. El reactivo así preparado se mantiene una semana en oscuridad a 37°C hasta su utilización.

Reactivo de Nelson, consta de las siguientes soluciones:

- a) A 25 g. de molibdato amónico hidratado, disueltos en 450 ml. de agua destilada, se añaden con cuidado 21 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitando al mismo tiempo.
- b) Se disuelven 3 g. de arseniato bisódico en 25 ml. de agua destilada. A continuación se mezclan ambas soluciones y se guarda en oscuridad a 37 °C, 48 horas en frasco opaco.

Procedimiento:

Se tomaron 0,1 ml. de líquido problema y se llevaron hasta 1 ml. con agua destilada, a continuación se añadió 1 ml. del reactivo de Somogyi, se agitó y se calentó al baño maría durante 15 minutos hirviendo. Pasado este tiempo se enfría y se añade 1 ml. del reactivo de Nelson, se agita de nuevo y se completa el volumen hasta 15 ml. con agua destilada.

En todos los casos se realizaron controles con blancos de agua destilada y de una solución patrón de glucosa.

Curva patrón de glucosa.

Se prepara una solución de glucosa anhidra 1 mM, a partir de esta solución se toman distintos volúmenes y se completan hasta 1 ml. con agua destilada.

La curva patrón se representa llevando en abscisas las distintas concentraciones de glucosa y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas a 540 nm.(Fig.1)

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración(μmoles/ml.)</u>	<u>Lectura(U.A.)</u>
0,05	0,05	0,06
0,1	0,1	0,08
0,2	0,2	0,16
0,3	0,3	0,23
0,4	0,4	0,29

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración (μmoles/ml.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,5	0,5	0,36
0,6	0,6	0,44
0,7	0,7	0,49
0,8	0,8	0,54
0,9	0,9	0,62
1,0	1,0	0,69

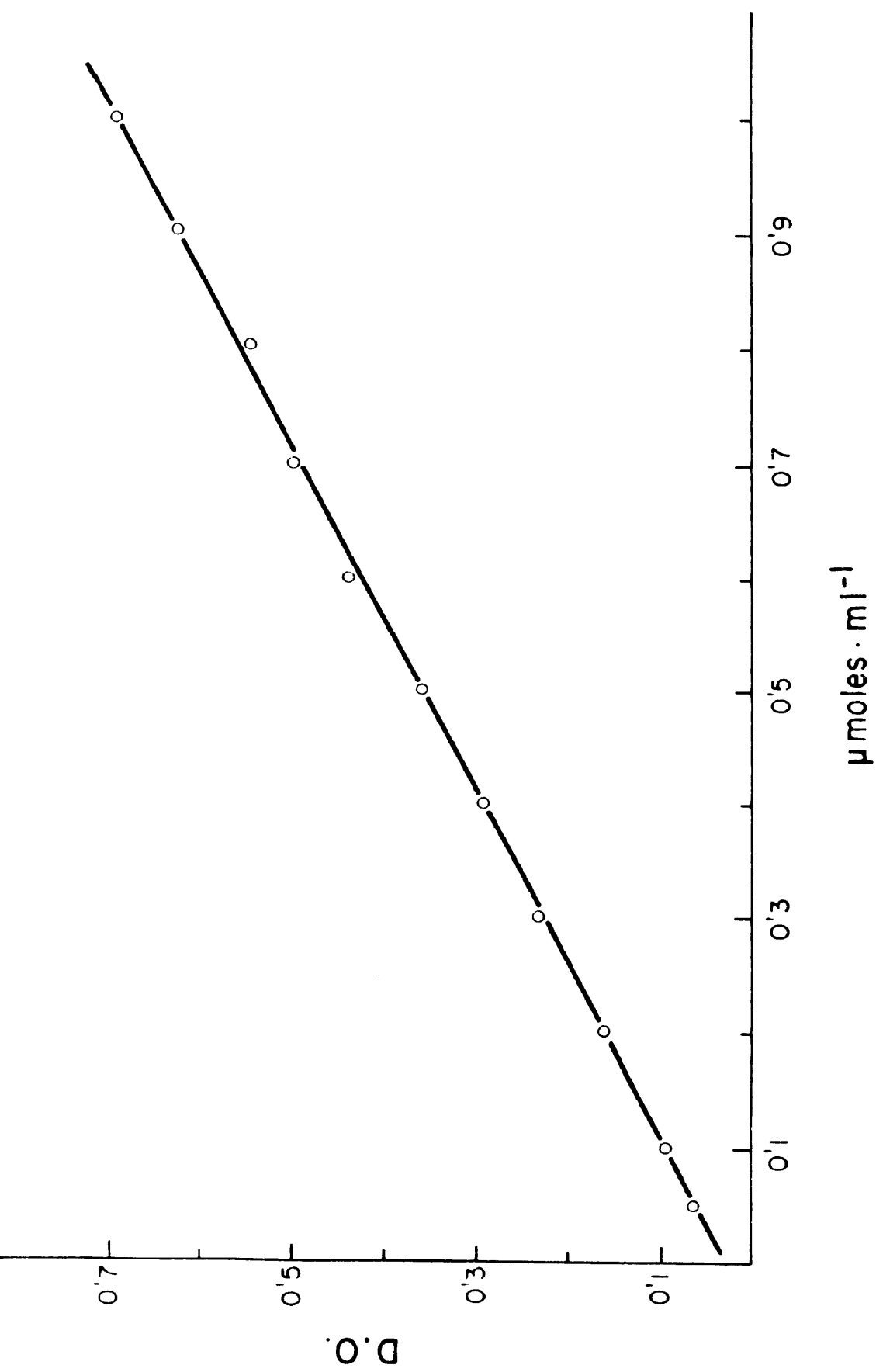


Fig. 1.- Curva patrón de glucosa.

II.8.- DETERMINACION DE PROTEINAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO.

La determinación de proteínas se realizó siguiendo el método de Lowry y col. (1951).

Fundamento:

Este método se basa en la reacción que se produce entre los aminoácidos aromáticos de las proteínas y la solución del reactivo Folin-Ciocalteu en condiciones alcalinas dando lugar a una reacción coloreada cuya intensidad se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660nm.

Reactivos:

Reactivo A. Solución alcalina de cobre:

- a) Carbonato sódico al 2% en NaOH 0,1 N.
- b) Sulfato cúprico al 1% en agua destilada.
- c) tartrato sódico potásico al 1% en agua destilada.

Para preparar esta solución se mezclan 50 ml. de a con 0,5 ml. de b y 0,5 ml. de c.

Reactivo B. Reactivo de Folin-Ciocalteu (1929).

Este reactivo se utiliza diluido 1:1 en agua destilada.

Procedimiento:

Se toman 0,1 ml. del líquido a valorar y se lleva hasta 0,6 ml. con agua destilada. Se añaden 3 ml. del

reactivo A, se agita y se mantiene a 37°C durante 20 minutos, transcurrido este tiempo se añaden 0,5 ml. del reactivo B, se agita y se pone de nuevo a 37°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo se determina la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

En cada determinación de proteínas se realizan controles con agua destilada y una solución patrón de proteínas.

Curva patrón de proteínas.

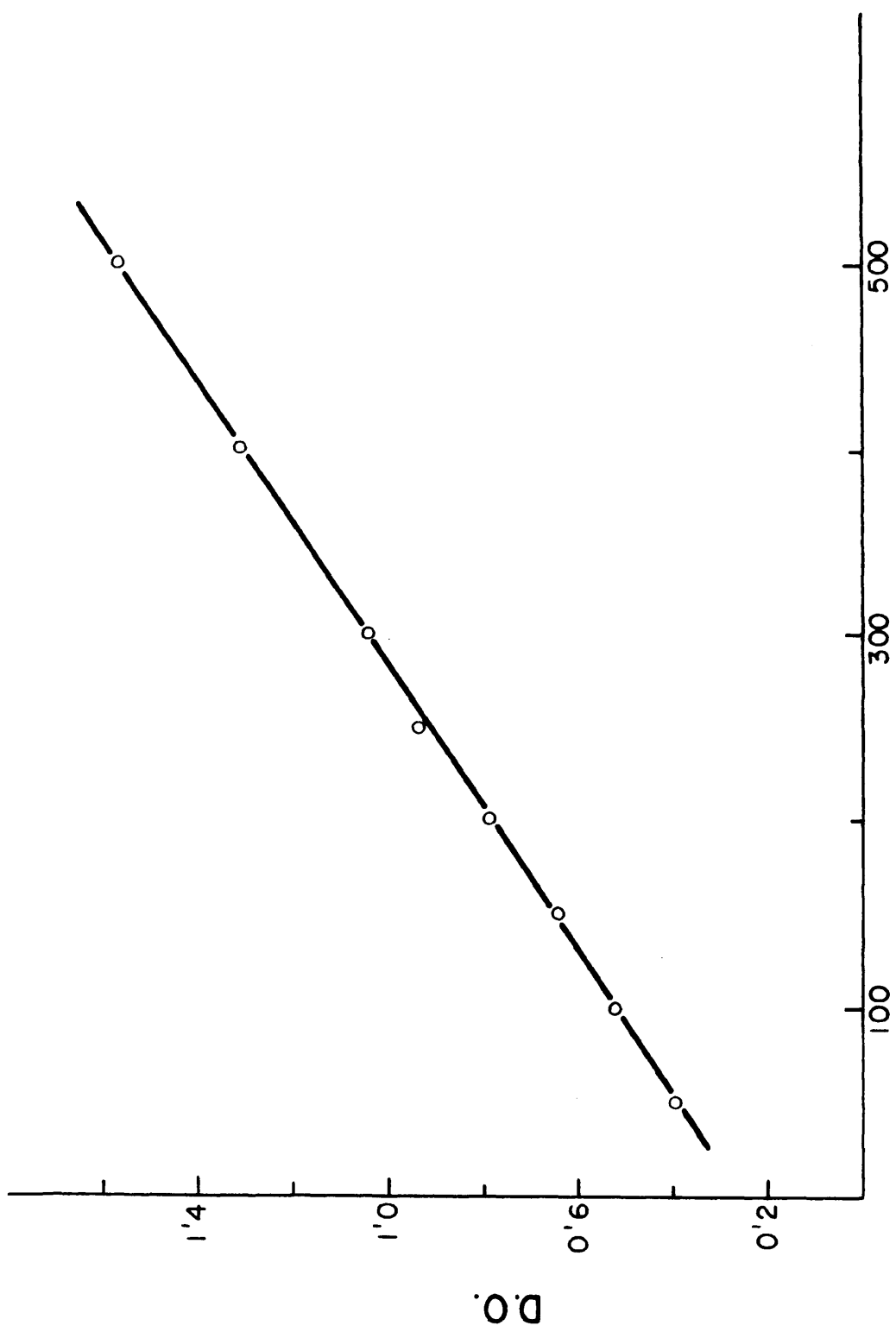
Se prepara una solución patrón de albúmina bovina cristalizada que contiene 1 mg/ml.

A partir de la solución patrón se toman distintos volúmenes que se completan hasta 0,6 ml. con agua destilada.

La curva patrón se obtiene representando en abscisas las distintas concentraciones de proteínas y en ordenadas las unidades de absorción. (Fig. 2)

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración (μg/0,6ml.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,05	50	0,39
0,10	100	0,52
0,15	150	0,64
0,20	200	0,80
0,25	250	0,97

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración ($\mu\text{g}/0,6\text{ml}$)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,30	300	1,05
0,40	400	1,34
0,50	500	1,57



μ gramos · 0.6 ml⁻¹

Fig. 2.- Curva patrón de proteínas.

II.9.- SOLUCIONES TAMPON UTILIZADAS.

II.9-1.- Tampón citrato-fosfato-borato (Teorell y Sthenhagen, 1938).

Este tampón es válido para un rango de pH entre 2 y 12 unidades.

Se compone de dos soluciones:

a) 7 g. de ácido cítrico hidratado, disueltos en 100 ml. de agua destilada. Por otro lado se disuelven 2 ml. de ácido fosfórico al 85 % en agua destilada y se añaden a la solución anterior. A esta mezcla se le agregan 3,54 g. de ácido ortobórico cristalizado y 343 ml. de una solución de NaOH 1N completando hasta 1000ml. con agua destilada.

b) Acido clorhídrico 0,1 N.

Para obtener la solución tampón a distintos pH, se mezclan 20 ml. de la solución a con x ml. de la solución b, llevando hasta 100 ml. con agua destilada. La cantidad x viene dada en las "Tablas Científica-Documenta Geigy, J.R.".

Para obtener la solución tampón de pH 5,5 y 50 mM se mezclan 20 ml. de la solución a con 42 ml. de la solución b y se llevan hasta 200 ml. con agua destilada.

II.9-2.- Tampón ácido cítrico - fosfato disódico de McIlvaine

ne.

Este tampón es válido para un rango de pH entre 2,2 y 8,0 unidades.

Se compone de dos soluciones:

- a) Acido cítrico 0,1 M.
- b) Fosfato disódico 0,2 M.

Para obtener la solución tampón a distintos valores de pH, se mezclan x ml. de la solución a con 100-x de la solución b. Para obtener un pH de 5,5 se mezclan 43 ml. de la solución a con 57 ml. de la solución b.

II.9-3.- Tampón de borato de Clark y Lubs.

Este tampón es válido para un rango de pH entre 7,8 y 10 unidades. (Clark y Lubs, 1917).

Se compone de dos soluciones:

- a) ácido bórico 0,1 M en cloruro potásico 0,1 M.
- b) hidróxido sódico 0,1 N.

Para obtener un pH de 9,8, se mezclan 50 ml. de la solución a con 40,8 ml. de la solución b, completando hasta 100 ml. con agua destilada.

II.9-4.- Tampón de fosfato de Sorensen.

Este tampón es válido para un rango de pH entre 5 y 8,2 unidades.

Se compone de dos soluciones:

a) fosfato monopotásico 1/15 M.

b) fosfato disódico 1/15 M.

Para obtener un pH de 7,4 unidades, se mezclan 91 ml. de la solución b con 9 ml. de la solución a.

II.10.- VALORACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL LIQUIDO DE CULTIVO.

II.10-1.- ACTIVIDAD EXO-1,3- β GLUCANASA.

El enzima 1,3- β glucano, glucanohidrolasa (E.C.3.2.1.6.), hidroliza enlaces 1,3- β glucano adyacentes.

La valoración de esta enzima se determinó según el método de McLellan(1970).

Sustrato:

El sustrato empleado fue la laminarina. Se prepara una solución a una concentración final de 1 mg/ml., en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 0,9 ml. de la solución de sustrato con 0,1 ml. de líquido de cultivo a 37 °C, durante un tiempo variable.

Paralelamente se realizan controles con agua destilada, sobrenadante de cultivo, blanco de sustrato y patrón de glucosa.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de glucosa liberada en la reacción, la cual se determina por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad glucanásica se define co-

mo la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

La actividad específica viene dada por el cociente entre las unidades de actividad enzimática y los mg. de proteínas.

II.10-2.- ACTIVIDAD ENDO-1,3(4)- β -GLUCANASA.

La enzima 1,3(4)- β -glucano glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.6.), hidroliza enlaces 1,3- β en estos compuestos.

Sustrato:

El sustrato empleado para la valoración de esta enzima fue el lichenan. Se prepara una suspensión de lichenan a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

La actividad de esta enzima se determina por la cantidad de glucosa liberada, según el método de Somogyi y Nelson.

Se incuban 0,9 ml. de la suspensión de sustrato con 0,1 ml. de líquido de cultivo a 37°C en estufa durante un tiempo variable.

Paralelamente a todas las determinaciones se realiza

lizan controles como en el caso anterior.

Una unidad de actividad glucanásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

II.10-3.- ACTIVIDAD 1,6- β -GLUCANASA.

El enzima 1,6- β -glucano glucanohidrolasa (E.C.3.2.1.6.), hidroliza enlaces 1,6- β -glucano adyacentes.

Sustrato:

El sustrato empleado fue el Pustulan. Se prepara una suspensión de este sustrato a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Para determinar la actividad de esta enzima se siguió el mismo método que para las anteriores.

II.10-4.-ACTIVIDAD CELULASA.

El enzima 1,4- β -glucano, glucanohidrolasa (E.C.3.2.1.4.), hidroliza enlaces 1,4- β -glucano en celulosa.

La actividad enzimática se ha determinado según el método descrito por Trager (1932) y Ziese (1931).

Sustrato:

El sustrato empleado fue carboximetil celulosa sódica. Se prepara una solución que contiene una concentración final de 1 mg/ ml. en tampón citrato-fosfato-borato 0,05 M y pH 5,5.

Procedimiento:

Igual que en los casos anteriores determinando la cantidad de glucosa liberada según el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad celulásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

II.10-5.- ACTIVIDAD α -AMILASA.

El enzima 1,4- α -D-glucan glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.1.), hidroliza enlaces 1,4glucano en polisacáridos que contienen 3 o más unidades de glucosa con enlaces 1,4.

La actividad se ha determinado según el método de Summer y Howell (1935).

Sustrato:

El sustrato empleado fue almidón soluble, se prepara una solución que contiene una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Para disolver el sustrato se calienta a 80 °C en baño maría.

Procedimiento:

Se sigue el mismo procedimiento que para las enzimas anteriores, valorando la cantidad de glucosa liberada por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad amilásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

II.10-6.- ACTIVIDAD INVERTASA.

El enzima β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, hidroliza enlaces β -D-fructofuranósidos en glucosa más D-fructosa, (E.C.3.2.1.26.).

La actividad se determinó según el método descrito por Metzenberg (1962).

Sustrato:

El sustrato empleado fue sacarosa, se prepara una solución de una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se sigue el mismo procedimiento que para las enzimas anteriores, valorando la cantidad de glucosa liberada.

Una unidad de actividad invertásica se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glu-

cosa por minuto.

II.10-7.- ACTIVIDAD DEXTRANASA.

El enzima 1,6- α -D-glucanoglucanohidrolasa, hidroliza enlaces 1,6- α glucano adyacentes, (E.C.3.2.1.11.).

Sustrato:

El sustrato empleado fue dextrano, se prepara una solución de dextrano T₁₀ a una concentración final de 1 mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se siguió el mismo procedimiento que para las enzimas anteriores valorando la cantidad de glucosa liberada según el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad dextranasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de glucosa por minuto.

II.10-8.- ACTIVIDAD FOSFATASA.

La enzima ortofosfato monoéster fosfohidrolasa, hidroliza los monoésteres ortofosfóricos en alcohol y ortofosfato.

La valoración de esta enzima se determinó según el

método de Brightwell y Tappel (1968).

Se determinaron las actividades fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina:

II.10-8-a.- ACTIVIDAD FOSFATASA ACIDA. (E.C.3.1.3.2.)

Sustrato:

El sustrato utilizado fue el p-nitrofenil ortofosfato disódico 4 mM, disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se siguió el mismo procedimiento que en los casos anteriores. Después del tiempo de incubación la reacción se para añadiendo 2 ml. de tampón de Clark y Lubs de pH 9,8.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de p-nitrofenol liberado, lo cual se determina colorimétricamente en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Una unidad de actividad fosfatásica es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de de p-nitrofenol por minuto.

II.10-8-b.- ACTIVIDAD FOSFATASA ALCALINA. (E.C.3.1.3.1.)

Sustrato:

El sustrato utilizado fue p-nitrofenil ortofosfato disódico 4 mM, disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 9,0.

Procedimiento:

Como en el caso anterior después del período de incubación la reacción se detiene añadiendo 2 ml. de tampón de Clark y Lubs pH 9,8.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de p-nitrofenol liberado, lo cual se determina colorimetricamente en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Una unidad de actividad fosfatásica es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol en 1 minuto.

II.10-9.- ACTIVIDAD QUITINASA.

La enzima poli(1,4- β -(2-acetamido-2-deoxi-D-glucósido)) glicanohidrolasa, hidroliza enlaces 1,4- β -acetamido-2-deoxi-D-glucósido en la quitina y quitodextrina, (E.C. 3.2.1.14.).

La actividad de esta enzima se ha valorado según el método de Tracey (1966).

Sustrato:

El sustrato utilizado para la valoración de la actividad quitinasa fue la quitina coloidal, esta quitina se obtuvo a partir de caparazones de gambas según el método de Jeuniaux (1966):

a) Los caparazones de gambas se tienen durante 2 horas lavándose con detergente para eliminar las partículas residuales.

b) se elimina el detergente lavando con agua destilada y centrifugando.

c) Los caparazones de gambas se tratan con ClH 1 N, añadiendo lentamente y agitando al mismo tiempo hasta que deje de desprender CO_2 , lo que nos indica una pérdida total del del carbonato que contienen.

d) Se lava varias veces con agua destilada.

e) Se mantienen durante 30 minutos en un baño maría con NaOH 0,5 N a 100°C . El hidróxido sódico extrae casi todo el pigmento.

f) Lavar con agua destilada, centrifugando hasta eliminar totalmente la sosa.

g) Tratar con MnO_4K 0,5 % a 60°C durante 20 minutos. Posteriormente lavar para eliminar el MnO_4K .

h) Tratar con $\text{S}_2\text{O}_5\text{Na}_2$ a media saturación, como agente blanqueador.

i) Se lava hasta la desaparición del piro-sulfito.

j) Tratar durante 30 minutos con alcohol para extraer los lípidos.

k) Lavar varias veces con agua destilada.

l) Triturar en medio acuoso.

m) Centrifugar.

n) Lavar el precipitado con acetona y secar.

Preparación de quitina coloidal:

A 200 g. de quitina se añaden 5 ml. de agua más 6,4 ml. de ácido sulfúrico concentrado, agitando lentamente y enfriando.

Una vez disuelta la quitina, se añade agitando 108 ml. de etanol frío al 50%. La quitina precipita, se centrifuga y se lava sucesivamente con agua destilada fría hasta que el pH sea aproximadamente de 5.

Se centrifuga y se recoge el precipitado, Esto se guarda en nevera como quitina coloidal para preparar las suspensiones que utilizamos como sustrato en el momento oportuno.

Curva de peso seco de quitina:

Se utiliza para determinar la cantidad de quitina que estamos utilizando como sustrato. Se prepara una suspensión de quitina coloidal en agua destilada. De esta suspensión se toman 0,5 y 1 ml. y se ponen en dos pesasustancias,

en estufa a 70 °C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se pesan y obtendremos los μ gramos por ml. que tenemos en esta suspensión.

A partir de esta suspensión tomamos distintos volúmenes que llevamos hasta 3 ml. con agua destilada que leemos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

La curva se representa en abscisas los μ g. de quitina y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas. (Fig.3)

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración (μg/ml)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,2	26,7	0,005
0,4	53,3	0,010
0,6	80,0	0,015
0,8	106,7	0,020
1,2	133,3	0,025
1,4	156,0	0,030

Procedimiento:

Se incuban 1 ml. de líquido de cultivo más 1 ml. de la suspensión de quitina coloidal disuelta en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5, que contiene aproximadamente 100 μ g. de quitina, en estufa a 37 °C durante un tiempo variable. Después del periodo de incubación esta suspensión se filtra con objeto de eliminar la quitina restan-

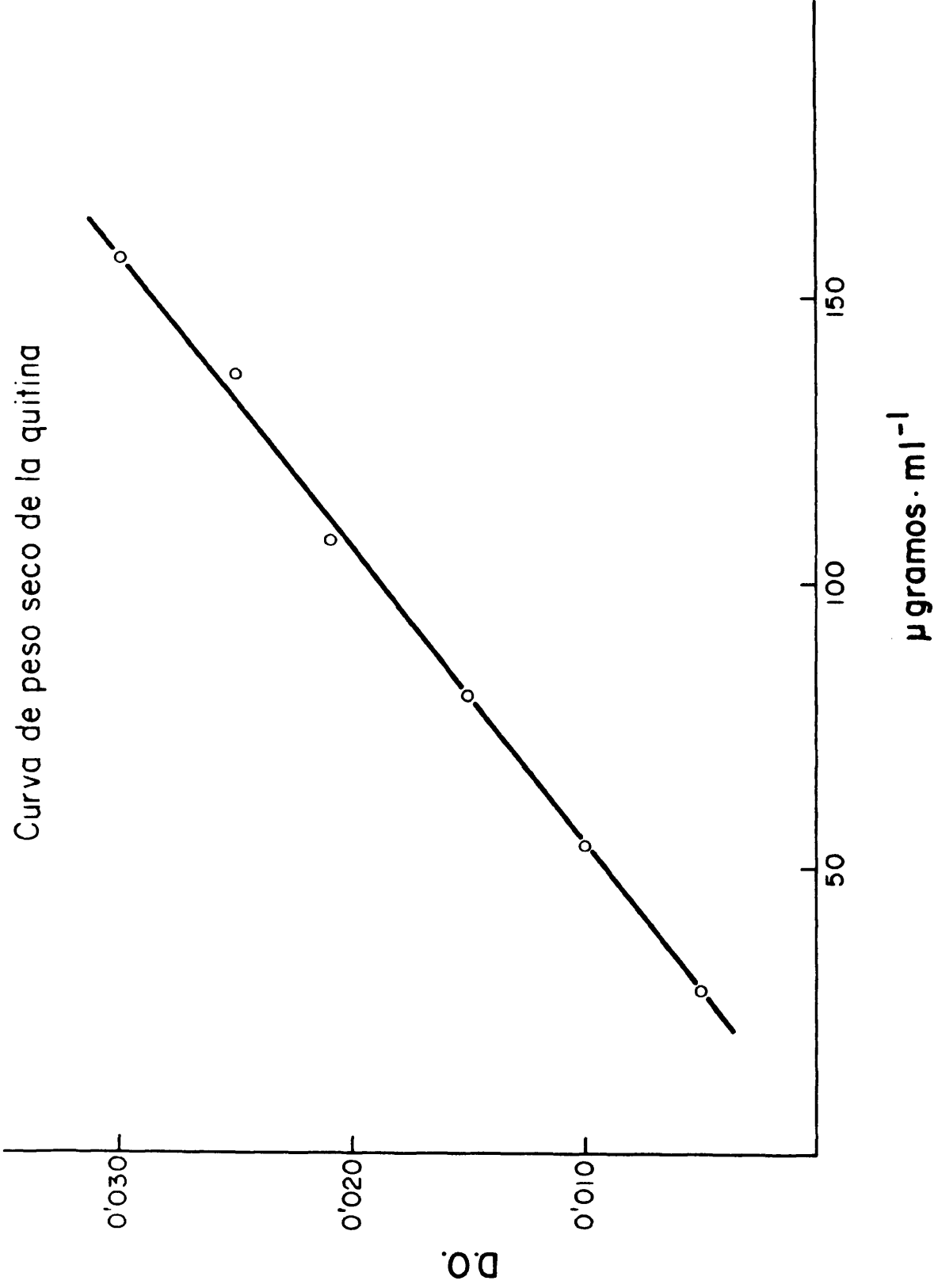


Fig. 3.- Curva de peso seco de la quitina.

te y detener la reacción.

La actividad quitinasa se valora por la liberación de N-acetilglucosamina producida al hidrolizar la quitina coloidal.

Una unidad de actividad quitinasa es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol. de N-acetilglucosamina por minuto.

Valoración de N-acetilglucosamina.

Se ha seguido el método descrito por Tracey (1954).

A partir de una solución que contiene N-acetilglucosamina, se toman 0,3 ml. y se le añade 0,1 ml. de una solución saturada de borato sódico, calentando a 100 °C durante 7 minutos. Se deja enfriar y se añaden 3 ml. de ácido acético glacial y 0,3 ml. de reactivo de Ehrlich, el cual se compone de 2 g. de p-dimetil amino benzaldehido disueltos en 100 ml. de ácido acético glacial más 5 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

Se deja a temperatura ambiente durante 1 hora para que se desarrolle un color violeta, que será más o menos intenso según la cantidad de N-acetilglucosamina presente.

El color se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Paralelamente con los problemas se realizan siempre controles de blancos de reactivos y sustrato.

Curva patrón de N-acetilglucosamina.

A partir de la solución patrón de N-acetilglucosamina se toman distitos volúmenes y se sigue el método anteriormente descrito. (solución patrón 0,1 M).

Representamos gráficamente la curva patrón en abscisas las distintas concentraciones tomadas y en ordenadas las unidades de absorción.(Fig.4).

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración ($\mu\text{mol}/0,3\text{ml.}$)</u>	<u>Lectura(U.A.)</u>
0,05	0,005	0,020
0,10	0,010	0,037
0,15	0,015	0,050
0,20	0,020	0,070
0,25	0,025	0,083
0,30	0,030	0,100

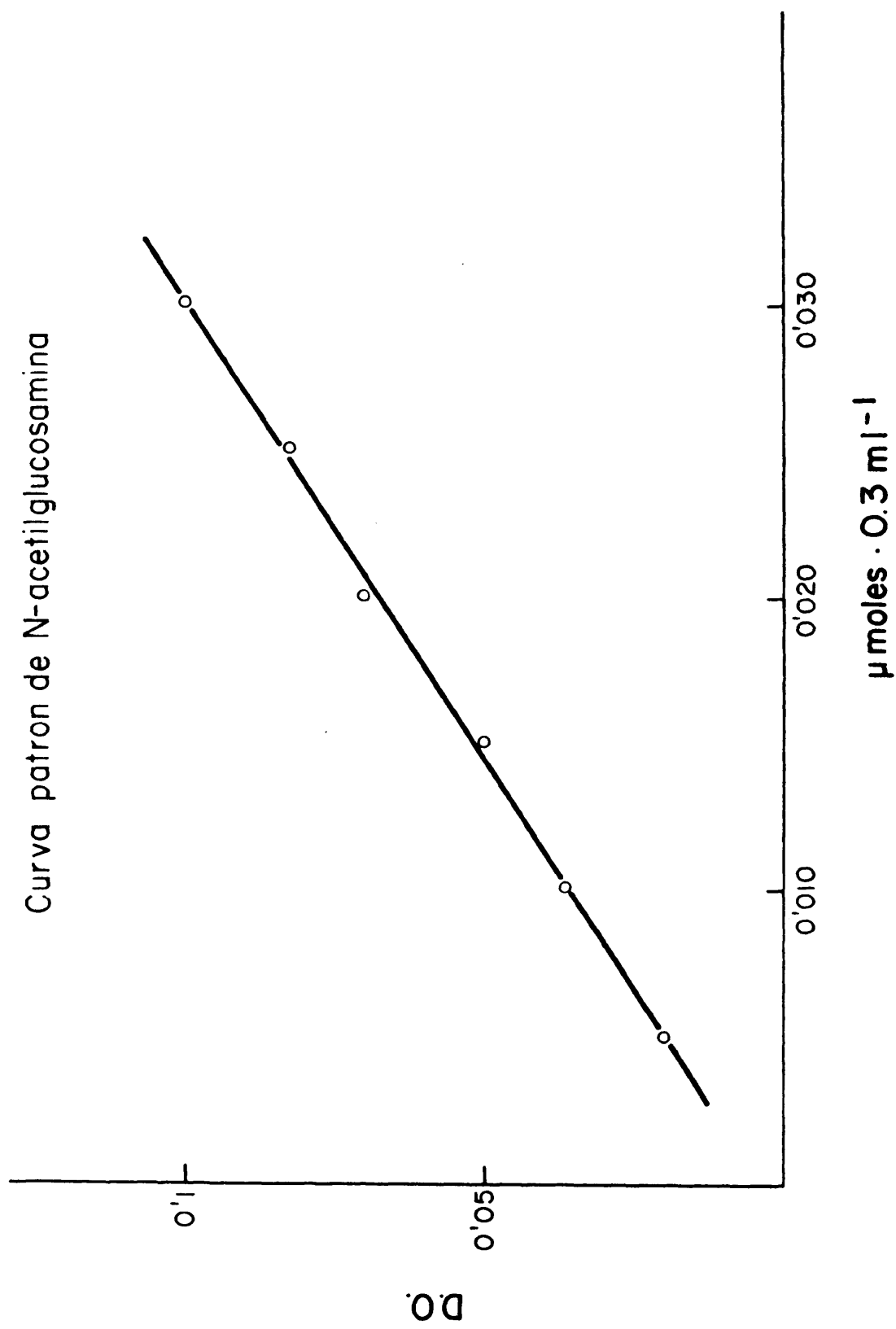


Fig. 4.- Curva patrón de N-acetilglucosamina.

II.10-10.- ACTIVIDAD GALACTURONASA.

El enzima poli-1,4- α -D-galacturónido glucano hidrolasa, (E.C.3.2.1.15.), hidroliza enlaces 1,4 α -D-galacturónidos en pectinas y otros galacturónidos (Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. Academic Press, 33,1976)

Según el sustrato sobre el que actuase la enzima las hemos dividido:

II.10-10-a.- ACTIVIDAD POLIGALACTURONASA.

Sustrato:

Poligalacturonato sódico a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 0,9 ml. de la solución de sustrato con 0,1 ml. de líquido de cultivo a 37 °C, durante un tiempo variable.

La actividad de esta enzima viene dada por la cantidad de ácido galacturónico liberado, el cual se valora colorimetricamente por el método de Somogyi y Nelson.

Paralelamente se realizan controles con agua destilada, sobrenadante de cultivo, blanco de sustrato y patrón de galacturónico.

Una unidad de actividad poligalacturonasa es la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido galac-

turónico por minuto.

Curva patrón de ácido galacturónico:

Se prepara una solución de ácido galacturónico 1mM a partir de esta solución se toman distintos volúmenes y se completan hasta 1 ml con agua destilada, y se determina la cantidad de azúcares reductores por el método de Somogyi y Nelson.

La curva patrón se representa llevando en abscisas las distintas concentraciones de ácido galacturónico y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas a 540 nm.(Fig.5).

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración μmol/ml.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,1	0,1	0,08
0,2	0,2	0,16
0,3	0,3	0,23
0,4	0,4	0,30
0,5	0,5	0,35
0,6	0,6	0,43
0,7	0,7	0,51
0,8	0,8	0,53
0,9	0,9	0,58
1,0	1,0	0,65

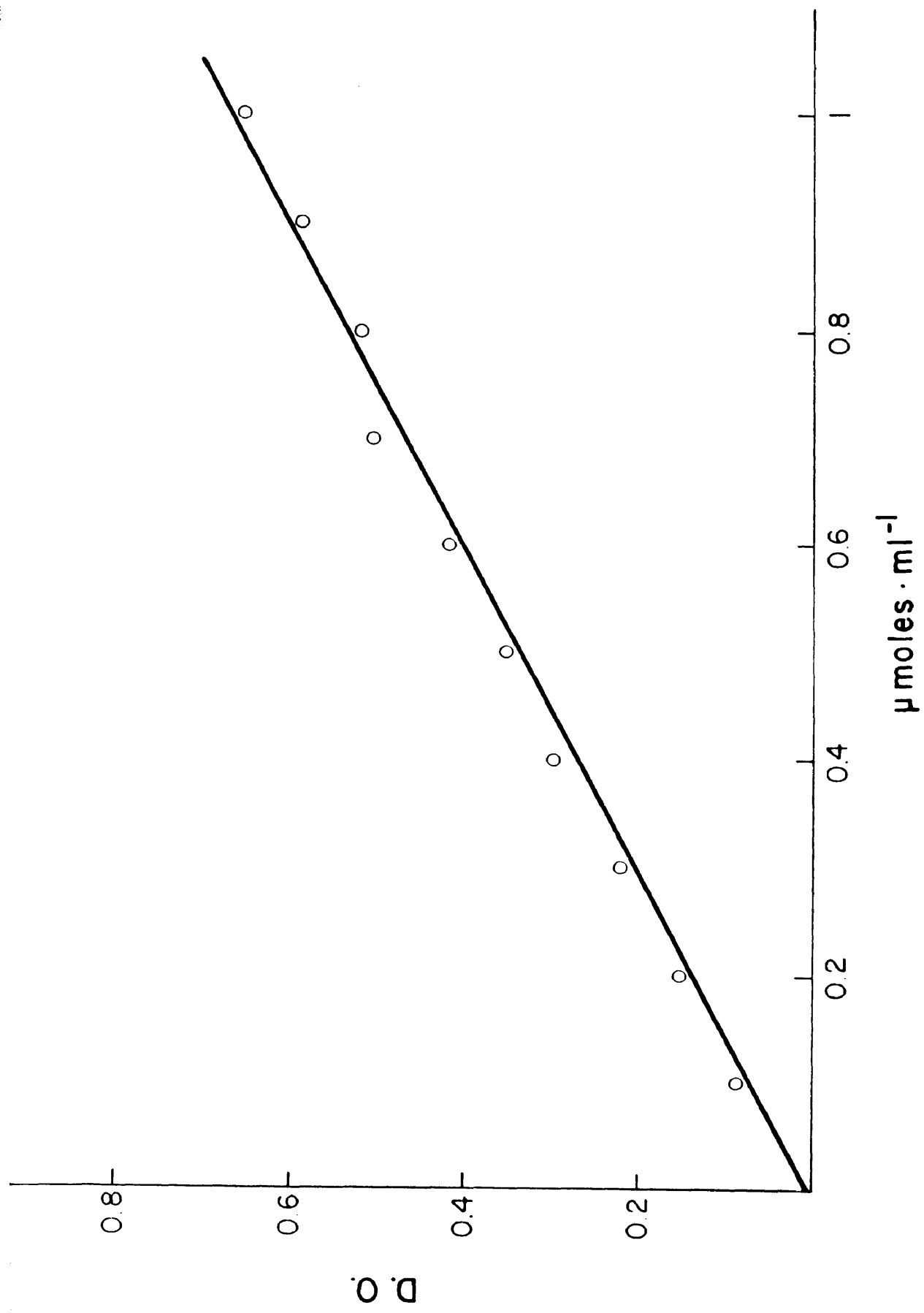


Fig. 5.- Curva patrón de ác. galacturónico (método de Somogyi).

II.10-10-b.- ACTIVIDAD POLIMETILGALACTURONASA.

Sustrato:

El sustrato utilizado fue pectina de manzana, se preparó una solución a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se siguió el mismo procedimiento que para la poligalacturonasa, determinando la cantidad de azúcares reductores liberados por el método de Somogyi y Nelson.

Una unidad de actividad polimetilgalacturonasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido galacturónico por minuto.

II.10-11.-ACTIVIDAD PECTINLIASA.

El enzima poli metil-D-galacturónido liasa (E.C. 4.2.2.10.), forma un doble enlace por el mecanismo de β -eliminación entre los carbonos 4-5 produciendo despolimerización.

Este enzima actúa sobre pectinas pero no sobre pectatos.

La valoración de esta actividad se realizó según el método de Hislop, Keon y Fielding (1979).

Sustrato:

El sustrato utilizado fue pectina de manzana, se preparó una solución a una concentración final de 1 mg/ml., en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 0,9 ml. de sustrato con 0,1 ml. de líquido metabólico, a 37 °C durante un tiempo determinado.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de urónidos liberados, lo cual se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 235 nm., valorando el incremento de la absorción producido entre la lectura inicial y la lectura final, es decir, antes y después de producirse la reacción enzimática.

Una unidad de actividad pectinliasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de urónidos insaturados en 1 minuto, basado en el coeficiente de extinción molar de 4600 para estas sustancias.

II.10-12.- ACTIVIDAD PECTATOLIASA.

El enzima poli-1,4- α -D- galacturónido liasa, (E.C. 4.2.2.2.) forma un doble enlace entre los carbonos 4-5, por el mecanismo de β -eliminación, produciendo despolimerización.

La valoración de esta actividad se realizó según
No actúa sobre la pectina.

el método de Hislop, Keon y Fielding (1979).

Sustrato:

El sustrato utilizado fue galacturonato sódico, se prepara una solución a una concentración final de 1 mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 0,9 ml. de sustrato con 0,1 ml. de líquido metabólico, a 37 °C durante un tiempo determinado.

La actividad enzimática viene dada por la cantidad de urónidos liberados, lo cual se determina en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 235 nm., valorando el incremento de la absorción producido entre la lectura inicial y la lectura final, es decir ,antes y después de producirse la reacción enzimática.

Una unidad de actividad pectatoliasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de urónidos insaturados por minuto, basado en el coeficiente de extinción molar de 4600 para estas sustancias.

II.10-13.- ACTIVIDAD ENDO(Pectina).

La despolimerización de la pectina, actividad endo, se siguió por la disminución de la viscosidad de una solución de este polisacárido en presencia del complejo enzimático.

La actividad endo frente a la pectina puede ser de-

bida a una polimetilgalacturonasa o a una pectinliasa, o el resultado de ambas actividades.

Sustrato:

El sustrato utilizado fue pectina de manzana, se prepara una solución a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 4,5 ml. de sustrato con 0,5 ml. de líquido metabólico, a 37 °C durante un tiempo determinado.

La actividad enzimática se determina midiendo el decrecimiento de la viscosidad a 30°C en un viscosímetro capilar (Cannon-Fenske, serie 50).

Una unidad de actividad enzimática, se define, como la cantidad de enzima que cataliza un decrecimiento de la viscosidad de un 1% (Keen y Horton 1966).

II.10-14.- ACTIVIDAD ENDO (Acido poligalacturónico).

La despolimerización del ácido poligalacturónico, actividad endo, se siguió por la disminución de la viscosidad de una solución sustrato en presencia del complejo enzimático.

Esta actividad puede ser debida a una poligalacturonasa o a una pectatoliasa, o el resultado de ambas actividades.

Sustrato:

El sustrato utilizado fue poligalacturonato sódico, se prepara una solución a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Procedimiento:

Se incuban 4,5 ml. de sustrato con 0,5 ml. de líquido metabólico a 37°C, durante un tiempo determinado.

La actividad enzimática se determina midiendo el decrecimiento de la viscosidad a 30°C en un viscosímetro capilar (Cannon-Fenske, serie 50).

Una unidad de actividad enzimática se define, como cantidad de enzima que cataliza una disminución en la viscosidad de un 1% (Keen y Horton 1966).

II.11.- METODO PARA DIFERENCIAR ACTIVIDADES HIDROLITICAS Y LIASICAS.

Se ha seguido el método descrito por Neukon (1950), modificado posteriormente por Serwood (1966).

Se incuban 5 ml. de la mezcla de reacción, enzima más sustrato, durante 3 horas a 37 °C, pasado este tiempo a 1 ml. de esta mezcla se le añaden 5 ml. de ClH 0,5 N y 10 ml. de ácido tiobarbitúrico 0.01 M disuelto en agua destilada.

Esta mezcla se calienta al baño maría durante 1 hora se enfría, se añade el volumen evaporado y se centrifuga a 10.000 g durante 20 minutos.

Se determina el espectro de absorción en el sobrenadante entre 480 y 580 nm.,

Simultáneamente a la mezcla problema se pone un control que tiene el enzima más sustrato a las 0 horas de incubación.

Un máximo de absorción a 510 nm. demuestra la existencia de una poligalacturonasa o una polimetilgalacturonasa, según el sustrato utilizado, ya que el ácido galacturónico y sus oligómeros tienen un máximo de absorción a 515 nm.

Un máximo de absorción entre 547 y 550 nm. correspondería a una pectinliasa o pectatoliasa, porque los compuestos de degradación de sustancias pécticas que tienen un doble enlace entre los carbonos 4-5 liberan un cromógeno con

con un máximo de absorción a 550 nm. cuando reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. (Bateman y Millar, 1966).

II.12.- PRECIPITACION DE PROTEINAS.

Para la obtención del complejo enzimático, el hongo Alternaria alternata se mantuvo en cultivo estacionario a 25 °C , en matraces de 1000 ml. de capacidad con 200 ml. de medio de cultivo, el medio elegido fue el denominado medio II, que contiene 0,5% de glucosa y 0.5% de pectina como fuente de carbono.

Las enzimas liberadas al medio de cultivo entre 25 y 27 días de incubación, se precipitaron con ácido tánico según el método de Shibata y Nisizawa (1965). Se añade una solución de ácido tánico al 10% al sobrenadante de tal manera que la concentración final sea del 1%, manteniéndose a 4°C durante un tiempo máximo de dos horas. A continuación el precipitado se separa por centrifugación a 6000 rpm. , se lava 3 veces con 10 ml. de acetona fría y se seca mediante una corriente de aire filtrado.

En estos precipitados se determinaron las actividades enzimáticas y se compararon con las obtenidas en precipitados proteínicos con acetona.

II.13.- CALCULO DEL GRADO DE AUTOLISIS.

El grado de autolisis alcanzado por los hongos a lo largo del período de incubación, se calcula por la pérdida de peso seco del micelio a partir del peso máximo y se expresa en %.

Para calcular el peso seco de las muestras, el micelio se separa del sobrenadante por filtración a través de papel Whatman nº1, se lava con agua destilada y se seca en estufa a 60 °C hasta alcanzar un peso constante, expresándose los resultados en mg/muestra.

II.14.- DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS CINETICAS DE LAS ENZIMAS.

En el complejo enzimático precipitado con ácido tánico se determinó para las enzimas pécticas el pH óptimo de actuación, la variación de la actividad enzimática con la concentración del enzima y la K_m y velocidad máxima.

II.14-1.- PH OPTIMO DE ACTUACION DE LA ENZIMA.

Cantidades determinadas de una solución acuosa de enzimas (mg/ml) en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM a valores de pH comprendidos entre 3 y 9 unidades, se incubaron en estufa a 37 °C durante un tiempo determinado para cada problema.

Paralelamente se llevan controles de sustrato , líquido problema, y de las soluciones tampón.

II.14-2.- VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA CONCENTRACION DE LA ENZIMA.

La variación de la actividad enzimática con la concentración de enzima se determina tomando diferentes concentraciones de la enzima, en nuestro caso hemos tomado de 10 a 100 μ l. de muestra, e incubando con una determinada cantidad de sustrato disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM,

al pH óptimo de cada enzima.

La representación gráfica nos da la proporcionalidad entre estas dos variables y el límite en algunos casos de esta proporcionalidad.

II.14-3.- DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN
(Km) Y LA VELOCIDAD MAXIMA (Vm).

Se ha seguido el método gráfico de Lineweaver-Burk.

Diferentes concentraciones de sustrato disuelto en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM , al pH óptimo de cada enzima se incuban con una determinada concentración de enzima.

Representando en ordenadas el inverso de los valores de la actividad enzimática y en abscisas el inverso de los valores de las concentraciones de sustrato, obtenemos una línea recta cuya intersección sobre el cuadrante negativo de la abscisa determina un valor de $-1/K_m$.

El punto de intersección de la recta con la ordenada nos da el inverso de la velocidad máxima, $1/V_m$.

II.15.- CROMATOGRAFIA EN PAPEL.

Se ha utilizado este método para caracterizar sustancias, se basa en comparar el camino recorrido sobre una matriz, en este caso papel Whatman nº 1, de unas sustancias problemas con el recorrido de unas sustancias conocidas.

Se siguió la técnica descendente. Para obtener una mejor separación seguimos el método de múltiple desarrollo descrito por Jeanes (1951).

Disolvente utilizado:

El disolvente utilizado fue n-butanol, ácido acético glacial y agua, en las proporciones 400:100:220 (v/v), recomendado por Block(1958).

Revelado para azúcares reductores.

Se ha seguido el método descrito por Trevelyan (1950), impregnando el cromatograma en una solución saturada de nitrato de plata en acetona.

Una vez seco el cromatograma se pulveriza con una solución de NaOH 0,5 N en etanol de 96%. Para evitar el envejecimiento del cromatograma con el paso del tiempo, se fijan las manchas, según la técnica descrita por Whistler y Wolfron (1962), introduciéndolo en un baño de NH_4OH 6 N, lavando con abundante agua y dejando secar.

Revelado para detectar ácido galacturónico:

Se ha utilizado el método descrito por Warren (1960).

Soluciones empleadas:

1º.- Solución de IO_4Na 0,2 M.

2º.- Etilen glicol, acetona y sulfúrico concentrado, en las siguientes proporciones 50:50:0,3 (v/v/v).

3º.- Acido tiobarbitúrico al 6%.

El cromatograma se pulveriza con la solución de IO_4Na , después de pasados 15 minutos, se vuelve a pulverizar con la solución de etilen glicol-acetona-sulfúrico y se esperan 10 minutos, pasados éstos se vuelve a pulverizar con el ácido tiobarbitúrico, se calienta el cromatograma a 100°C durante 5 minutos.

Aparecen en el cromatograma unas manchas rojas que bajo luz ultravioleta dan una fluorescencia roja.

Este método es capaz de detectar cantidades de 0,5 μg . de ácidos urónicos.

Las muestras utilizadas para detectar la posible presencia de ácido galacturónico fueron paredes y líquido metabólico del hongo A. alternata, previamente hidrolizados con ácido sulfúrico 1 N, en ampolla cerrada a 100°C entre 1 y 2 horas. Al cabo de este tiempo se neutraliza con hidróxido bórico, se centrifuga y se pasa a través de un filtro Millipore de 0,22 μm .

II.16.-FILTRACION EN GEL.

La filtración en gel es una técnica que permite la separación de macromoléculas de distinta naturaleza y tamaños, independientemente de los efectos que puedan tener sobre ellas factores como cambios en el pH, fuerza iónica, iones metálicos, cofactores, detergentes, urea etc.

Su fundamento se basa en la capacidad de las moléculas que hay en una muestra para entrar en los pequeños poros, existentes en la fase estacionaria. Las moléculas grandes no entran y se mueven rápidamente a través del soporte cromatográfico. Las moléculas pequeñas entran en los poros y esto hace que se muevan más lentamente. Las moléculas son eluidas en orden decreciente a su tamaño molecular.

II.16-1.- FILTRACION EN GEL CON SEPHADEX.

El sephadex es un gel preparado por polimerización de dextrano con epiclorhidrina. El gran número de grupos hidroxilo, hace que el gel sea muy hidrofílico por lo que se hincha considerablemente en soluciones electrolíticas y en agua.

Procedimiento:

Muestras de 10 mg.de proteínas, precipitadas con

ácido tánico, y disueltas en 4 ml. de tampón citrato-fosfato borato 50 mM y ph 5,5, se introdujeron en una columna (Pharmacia K 26/ 70) de sephadex G-200, previamente equilibrada con tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5 en presencia de azida al 0,02%.

La velocidad de elución fue de 20 ml/hora. Las fracciones recogidas fueron de 3,5 ml. El V_o de la columna fue medido con Dextran blue de peso molecular $2 \cdot 10^6$.

En cada fracción fueron determinadas proteínas y actividades enzimáticas frente a la pectina y al ácido poligalacturónico.

Determinación del peso molecular en sephadex G-200.

Se ha seguido el método descrito por Andrews (1965).

Se eligió sephadex G-200 ya que puede separar proteínas en un amplio margen de pesos moleculares.

La columna fue equilibrada con las siguientes proteínas de peso molecular conocido:

<u>Proteínas</u>	<u>Peso molecular</u>
Lysozima	14.000
Ovoalbúmina	45.000
Albúmina bovina	67.000
Catalasa	210.000

Para calcular el peso molecular de las proteínas se han tenido en cuenta los siguientes parámetros:

V_0 = Volumen de las moléculas que están solamente distribuidas en la fase móvil del gel, ya que su tamaño es mayor que los poros del gel.

V_e = Volumen de elución de la muestra.

V_s = Volumen de la fase estacionaria, el cual es difícil de determinar por lo que se obtiene:

$$V_s = V_t - V_0.$$

El coeficiente de distribución se define por analogía con otros tipos de partición cromatográfica como el cociente:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Siempre que K_{av} sea mayor que 1 hay retención de moléculas en la columna. Si K_{av} es igual a 0 las moléculas no son retenidas porque el volumen de elución de la muestra es igual al volumen de elución de la columna. Si K_{av} es menor que 1, la columna está mal preparada.

El coeficiente de retención se define como el cociente entre el volumen de elución de la muestra y el volumen de elución de la columna:

$$R = \frac{V_e}{V_0}$$

Se han realizado tres experimentos, la media de los cuales nos da un valor de V_e para cada una de las pro-

teínas patrón de P_m conocido, con esto y el valor de V_e de cada proteína problema podemos calcular el peso molecular de cada una de ellas. El cálculo de errores nos indica que cada muestra está afectada por un error de aproximadamente 5000 daltons.

II.16-2.- FILTRACION EN BIO-GEL P_2 .

El Bio-gel P_2 es un gel de poliacrilamida, preparado por co-polimerización de acrilamida y N,N'-metileno-bisacrilamida, similar a los geles usados en las electroforesis de geles de poliacrilamida.

Se utiliza para separar moléculas de pequeño peso molecular, con un poder de separación similar al del sephadex G-10 y G-15.

II.17.- ELECTROENFOQUE.

Esta técnica consiste en la separación de proteínas por su punto isoeléctrico (P.I.) en un gradiente de pH. Se siguió el método descrito por Vesterberg y Svensson (1966).

Si una proteína se añade a una solución que tiene un pH más alto que su punto isoeléctrico, pierde protones y se queda negativamente cargada, por el contrario si la proteína se añade a una solución con un pH más bajo que su punto isoeléctrico, toma protones y queda positivamente cargada.

Cuando se estudia por electroenfoque una mezcla de proteínas con puntos isoeléctricos comprendidos en el rango del gradiente de pH utilizado, cada proteína adquiere diferente carga según su PI y el pH donde la proteína se ha localizado. Al someter éstas proteínas a la corriente eléctrica, éstas se dirigen al cátodo o al ánodo según su carga quedando localizadas en la zona donde el pH sea igual a su punto isoeléctrico.

La fuerza que contrarresta el electroenfoque es la difusión. Como el coeficiente de difusión es inversamente proporcional al peso molecular, las proteínas que mejor se separan son las de mayor Pm.

Con objeto de disminuir la difusión y las corrientes de convección propias de los líquidos se emplea un gradiente lineal de sacarosa o glicerol de abajo a arriba de la co

lumna.

Se utilizó una columna de 110 ml. de capacidad, modelo LKB 8101, y el gradiente de pH se obtuvo con Ampholine LKB, a una concentración final del 1%, en el rango de pH de 3,5 a 10, a 600 voltios durante 72 horas y a 6°C. El gradiente lineal de sacarosa se obtuvo con un formador de gradientes LKB 8121. El cátodo (etilendiamina) se colocó en la parte superior de la columna y el ánodo (ácido fosfórico) en la parte inferior.

Procedimiento:

Muestras de 10 mg. de proteínas del hongo Alternaria alternata, precipitadas con ácido tánico a los 27 días de crecimiento, son introducidas en la columna.

Las fracciones recogidas fueron de 4 ml., en ellas determinamos el pH, para la valoración de las actividades enzimáticas las fracciones fueron dializadas durante 60 horas frente a agua destilada a 4°C.

II.18.- ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Se ha utilizado la técnica descrita por Ornstein (1961) y Davis (1964).

Esta técnica denominada electroforesis de disco es una electroforesis de zona en un gel que consta de dos secciones de distinta porosidad y pH.

La muestra de proteínas a analizar es sometida a un proceso de concentración en la primera zona de la columna de electroforesis. En el gel hay dos iones cuya carga es la misma que la de los iones de la muestra a un pH dado; uno de éstos iones es más rápido y otro más lento que todos los iones de la muestra a este pH.

La polaridad eléctrica se pone en la dirección de la migración de la muestra. Al aplicar el voltaje, ésta se separa en zonas continuas en orden a sus movilidades relativas.

Las proteínas van entrando en la segunda sección de la columna electroforética, denominado gel de separación, donde hay unas nuevas condiciones de pH y tamaño de poro. La movilidad de los iones más lentos aumenta en esta zona y pasan a través de las muestras de proteínas, estableciendo un gradiente de voltaje uniforme donde se separan éstas.

Soluciones empleadas en el gel de separación:

A.- Tampón tris-ClH, pH 8,9 que consta de

ClH 1N..... 48 ml.
Tris 36,6 g.
Temed..... 0,23 ml.
H₂O destilada hasta ...100 ml.

Tris: 2-amino-2 hydroximetil 1-3 propanodiol

Temed: N-N-N'-N' tetrametil etilendiamina.

B.- Acrilamida..... 28 g.
Bisacrilamida..... 0,735 g.
H₂O destilada hasta100 ml.

C.- Persulfato amónico..... 0,14 g.
H₂O destilada hasta100 ml.

Soluciones empleadas en el gel de concentración:

D.- Tampón tris-ClH, pH 6,7, que consta de

ClH 1N..... 48 ml.
Tris..... 5,98 g.
Temed..... 0,46 ml.
H₂O destilada hasta100 ml.

E.- Acrilamida 10 g.
Bisacrilamida..... 2,5 g.
H₂O destilada hasta.....100ml.

F.- Riboflavina..... 4 mg.

H₂O destilada hasta100 ml.

G.- Sacarosa..... 40 g.

H₂O destilada hasta.....100 ml.

Se han utilizado para nuestras proteínas geles de poli-
acrilamida al 7%, para lo cual las proporciones de las so-
luciones en el gel de separación fueron las siguientes:

Solución A 1 volumen

Solución B 2 "

Solución C 4 "

H₂O destilada 1 "

Estas soluciones y el agua destilada se mezclan en
un kitasato y el aire se extrae mediante vacío, agitando ma-
nualmente durante aproximadamente un minuto. A continuación
se procede a llenar los tubos de electroforesis.

Las proporciones en el gel de concentración fueron
las siguientes:

Solución D 1 volumen

Solución E 2 "

Solución F 1 "

Solución G 4 "

Tampón de los electrodos.

La solución tampón utilizada fue Tris-glicina a un pH de 8,3. Se prepara una solución concentrada que se diluye 10 veces para su empleo.

Como indicador del frente de migración se utilizó azul de bromofenol, añadiendo unas gotas en el tampón de la parte superior de la cubeta.

La intensidad de la corriente fue de 1 miliamperio por gel durante los primeros 20 minutos, aproximadamente hasta que la muestra entra en el gel de separación y posteriormente de 2 miliamperios por gel.

La duración media para la separación de este complejo enzimático fue de 5 horas.

II.18-1.- ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA-PECTINA.

Se ha utilizado el método descrito por Cruickshank y Wade (1980), modificado parcialmente.

Con este método es posible detectar enzimas pécticas en geles de poliacrilamida. En nuestro caso hemos utilizado geles de poliacrilamida al 7% a los que se añadió pectina en una proporción de 1%.

La electroforesis se realiza a 2°C. Una vez finalizada, los geles se incuban a 37°C en una solución de ácido málico 0,1 M y en una solución de ácido málico 0,1 M con Cloruro cálcico 0,002 M.

El tiempo de incubación es variable dependiendo de la actividad del complejo así como de la concentración de proteínas por gel.

Coloración para enzimas pécticas.

Después del período de incubación, los geles se lavan con agua destilada y se tiñen con una solución de Rojo de rutenio al 0,02%, durante un tiempo de dos horas como máximo. A continuación los geles se lavan en agua destilada varias veces, hasta que la presencia de la actividad enzimática se ponga de manifiesto.

La actividad poligalacturonasa se detecta porque produce en el gel unas zonas menos teñidas que el resto.

II.19.- MACERACION DE TEJIDOS.

Hemos utilizado el método descrito por Ishii (1976).

Se han empleado tejidos de patata, zanahoria y tomate para estudiar la capacidad de maceración del complejo enzimático de Alternaria alternata.

La patata, zanahoria y tomata son desinfectados superficialmente en una solución que contiene:

Cloruro mercurico	2%
ClH concentrado	7 ml.

Después de 30 minutos sumergidos en esta solución, se lavan varias veces con agua destilada estéril.

Cuadrados de estos tejidos de aproximadamente 4 g. de peso se colocaron en matraces de 100 ml. de capacidad.

Se prepararon tres series de matraces con la siguiente composición:

serie 1ª.- tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y
pH 5,5, esterilizado en autoclave a 120°C
durante 20 minutos.

serie 2ª.- tampón de McIlvaine 0,1 M y pH 5,5, esterilizado en autoclave a 120°C y durante
20 minutos.

serie 3ª.- agua destilada estéril.

Cada matraz contiene 25 ml. de una de estas soluciones con 8 cuadrados de los distintos tejidos y se le añade 1 ml. de la solución de enzimas, precipitadas con ácido ténico, a una concentración de 1 mg/ml. en agua destilada estéril.

Paralelamente se realizan controles con los tejidos vegetales sin solución de enzimas, pero bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación.

Los matraces se incuban en un agitador-incubador crbital "Gallemkamp, modelo IH, 400". El tiempo de incubación varía según el tejido y la capacidad del complejo enzimático.

Después del período de incubación la mezcla de reacción se filtra a través de una malla de 24 mesh. Todas las células que pasan a través del filtro son células libres, como lo confirma el examen al microscopio. Cuando las células han sedimentado, alrededor de dos horas a temperatura ambiente, se compara su volumen.

La estimación de la maceración fue realizada a partir de las siguientes medidas:

- 1º.- Volumen de células individuales liberadas del tejido.
- 2º.- Valoración del ácido galacturónico en el líquido filtrado.

3º.- Determinación del incremento de la conducti-
vidad.

4º.- Determinación de las sustancias reductoras en
el líquido filtrado.

5º.- Observación de la capacidad de las células pa-
ra acumular rojo neutro.

1º.- Volumen de células sedimentadas.

Los trozos de tejido se separan de las células
libres por filtración, 5 ml. del filtrado se colocan en tubos
test para comparar el volumen de las células sedimentadas en
los tampones , en el agua y en los controles.

2º.- Valoración del ácido galacturónico.

El contenido en ácido galacturónico de los fil-
trados fue determinado por el método del carbazol descrito
por Kabat y Mayer's (1961).

A 1 ml de la solución problema que puede con-
tener entre 5 y 100 μ g. de ácidos urónicos por ml., se aña-
den 6 ml. de ácido sulfúrico concentrado, enfriando al mis-
mo tiempo. Esta mezcla se calienta al baño maría hirviendo
durante 20 minutos, después se enfría hasta temperatura ambien-
te y se añaden 0,2 ml. de carbazol al 0,1 % en etanol, la mez-
cla se agita con cuidado y se deja de 10 minutos a 1 hora co-
mo máximo a temperatura ambiente, se desarrolla un color rosá

ceo que se lee en un espectrofotómetro a una longitud de 530nm.

Simultáneamente se realiza la misma determinación con blancos de tampón y de agua.

Solución patrón de ácido galacturónico.

Se prepara una solución de ácido galacturónico 1 mM. Para ello se disuelven 19,5 mg. en 100 ml. de agua destilada, en matraz aforado.

Curva patrón de ácido galacturónico.

A partir de la solución patrón de ácido galacturónico, se toman distintos volúmenes y se completan hasta 1 ml. con agua destilada, determinando a continuación el ácido galacturónico según el método del Carbazol.

La curva patrón se representa gráficamente llevando en abscisas las distintas concentraciones de ácido galacturónico y en ordenadas las unidades de absorción obtenidas al leer a una longitud de onda de 530 nm. (Fig.6).

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración (μmol/ml.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,05	0,05	0,043
0,1	0,1	0,077
0,2	0,2	0,095
0,3	0,3	0,120
0,4	0,4	0,170
0,5	0,5	0,205
0,6	0,6	0,240

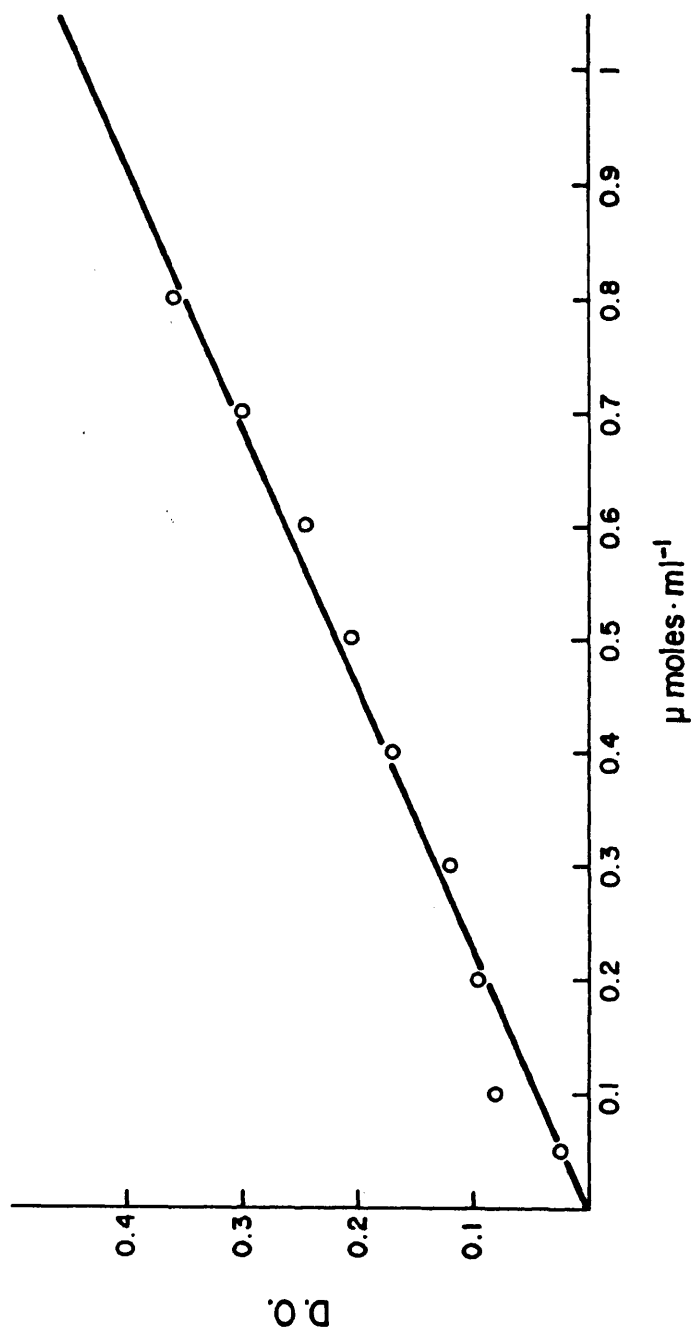


Fig. 6.- Curva patrón de ac. galacturónico (método del carbazol)

<u>Volumen (ml.)</u>	<u>Concentración (μmol/ml.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>
0,7	0,7	0,300
0,8	0,8	0,360

3º.- Determinación de la conductividad.

Los cambios en la permeabilidad del tejido vegetal producidos por la acción de las enzimas, se mide determinando el incremento de la conductividad en el filtrado de la mezcla de reacción.

La medida de la conductividad nos determina la cantidad total de iones en solución y con ella estudiamos las variaciones de concentración iónica en el líquido donde se efectúa la maceración.

La conductividad se mide en un conductímetro "Philips, modelo PW 9504/00", previamente ajustado con una disolución patrón de ClK 0,1 N.

Durante la determinación el líquido se mantiene a una temperatura constante de 25°C mediante un baño termostático de agua, ya que la acción de la temperatura sobre la conductividad es positiva, es decir, la conductividad aumenta cuando la temperatura asciende, debido a la influencia tanto de la ionización de las combinaciones como de la movilidad de los iones.

Cálculo de la conductividad.

Los valores obtenidos en resistividad, se pasan

a conductividad y se multiplican por el inverso del factor constante que corresponde a la célula del aparato.

$$C = \frac{1}{R} \cdot \frac{1}{f} = \mu\text{mho/cm.}$$

R= resistividad

f= constante de la célula = 1,46 cm.

C= conductividad expresado en $\mu\text{mho/cm.}$

Como los valores de conductividad que se obtienen son muy bajos, los resultados se multiplican por 10^6 y expresamos la conductividad en mho/cm.

4º.- Determinación de sustancias reductoras.

Las sustancias reductoras se determinaron en el líquido de reacción después de filtrarlo a través de papel de filtro Whatman nº 1, siguiendo el método descrito por Somogyi (1945) y Nelson (1944).

5º.- Capacidad de las células para acumular rojo neutro.

Hemos seguido el método descrito por Basham y Bateman (1975), basado en el ensayo de rojo neutro de Tribe (1955).

Los cuadrados de tejidos, tratados con la so-

lución enzimática, se sumergen en una solución que contiene:

NO_3K 0,6 M

Cl_2Ca 1 mM

Tampón fosfato 20 mM, pH 7,5

Rojo neutro 0,01%

Después de 20 minutos se elimina esta solución y el tejido se lava con 3 ml. de NO_3K 0,6 M varias veces.

La pérdida de la capacidad de las células para acumular rojo neutro muestra, en observación al microscopio óptico, la muerte de las células.

Este hecho se compara con cuadrados de tejidos que no han sido tratados enzimáticamente y han sido sometidos al mismo proceso.

II. 20 .- OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

El término protoplasto ha sido definido como la parte de la célula que es capaz de vivir sin pared celular y puede ser plasmolizada.

El protoplasto es una célula rodeada del plasma-
lema y potencialmente capaz de regenerar la pared, crecer y dividirse (Vasil, 1976). La ausencia de pared permite en el protoplasto una serie de manipulaciones que no son posibles en la célula intacta.

La pared puede eliminarse por un proceso mecánico o por un proceso enzimático. El proceso mecánico para la obtención de protoplastos ha sido ampliamente superado por el desarrollo de los procesos enzimáticos.

Para la obtención de protoplastos normalmente se utiliza una mezcla de pectinasas y celulasas, ya que no solamente es necesario macerar el tejido sino que es necesario liberar al protoplasto de la pared celular (Power y Cocking, 1970).

Nosotros utilizamos en nuestro estudio un extracto enzimático del hongo Alternaria alternata , precipitado con ácido tánico, que posee ambos tipos de actividades.

Los protoplastos deben ser protegidos osmóticamente durante el proceso de ataque a la pared y posterior liberación.

La fuente de protoplastos ha sido tubérculo de patata (Solanum tuberosum), rizoma de zanahoria (Daucus carota) y fruto de tomate (Lycopersicum sculentum). Se preparan cuadrados de tejidos que se someten a la acción enzimática con estabilizadores osmóticos.

Los estabilizadores osmóticos utilizados fueron manitol, sorbitol,

La concentración enzimática varía según la naturaleza del tejido.

Las condiciones para la obtención de protoplastos fue de 25°C y una agitación de 120 rpm, en un agitador incubador orbital, durante un tiempo de 3 a 5 horas.

III.- RESULTADOS

III.1.- PARAMETROS ESTUDIADOS EN LAS MUESTRAS.

Los parámetros estudiados en las muestras, tomadas de los cultivos de 12 hongos con el fin de seleccionar aquel que presentase unas actividades pécticas más altas, fueron los siguientes:

- Medida del pH en el líquido de cultivo.
- Grado de autólisis.
- Sustancias reductoras.
- Proteínas.
- Actividad enzimática:

Poligalacturonasa

Polimetilgalacturonasa.

III.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN *Mucor rouxii*.

El peso máximo de este hongo se observó alrededor del día sexto de incubación y el grado de autólisis fue del 58%.

El pH del medio desciende durante la fase de crecimiento, para producirse un ligero incremento que coincide con el comienzo de la fase de autólisis, todo el proceso degradativo se desarrolla a unos valores de pH ácido.

Las sustancias reductoras descienden llegando a desa parecer totalmente durante la fase de degradación. Las pro-teínas, por el contrario, aumentan en la fase autolítica manteniendo en niveles constantes a lo largo del proceso.

Las actividades enzimáticas determinadas en este primer estudio comparativo, poligalacturonasa y polimetilgalac-turonasa, fueron altas en los días en que el hongo aumenta de peso y descendieron en la fase de autólisis hasta su total i-nactivación.

En Mucor rouxii se observaron los valores de activi-dades más altos tanto frente a pectina como frente al ácido poligalacturónico.

Los resultados se encuentran representados en la ta-bla I.

III.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Rhizopus stolonifer.

En cultivo estacionario este hongo alcanzó el crecimiento máximo el día 6 de incubación. La masa miceliar en estas condiciones de cultivo, es inferior a la del resto de los hongos; el grado de autólisis es también pequeño, no superando nunca el 36%.

El pH desciende durante la fase de crecimiento, ex-perimentando una ligera subida con el inicio de la fase de

autolisis, manteniéndose después a un pH ácido constante.

Las sustancias reductoras en el líquido de cultivo no llegan a desaparecer totalmente, manteniéndose siempre niveles bajos. Las proteínas en el líquido de cultivo aumentan en la fase de autolisis.

Las actividades enzimáticas frente a pectina y al ácido galacturónico variaron mucho de una muestra a otra sin poder concluir que haya una relación con la fase de autolisis.

Los resultados están representados en la tabla II.

III.4.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Rhizopus arrhizus.

El crecimiento máximo de este hongo fue alcanzado alrededor del cuarto día de incubación, llegando a un peso máximo inferior al de otros hongos estudiados, el grado de autolisis fue del 45%.

Toda la fase de autolisis se desarrolla a un pH ácido, el pH inicial del medio es 5,5 y desciende a los dos días de incubación manteniéndose constante durante el resto del proceso.

Las sustancias reductoras, lo mismo que ocurre con R.stolonifer, no llegan a desaparecer totalmente del medio.

En cuanto a las proteínas, durante la fase de cre-

cimiento descienden alcanzando los valores más bajos el día que comienza la autólisis, iniciando un leve aumento durante el proceso degradativo.

Las actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa, igual que ocurría con R.stolonifer, son muy variables de una muestra a otra, siendo mayor la actividad frente al ácido poligalacturónico que frente a la pectina.

Podríamos deducir que ambos hongos R.stolonifer y R.arrhizus se comportan de un modo similar en estas condiciones de cultivo.

Los resultados se encuentran representados en la tabla III.

III.5.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Cunninghamella elegans.

Este hongo alcanzó el crecimiento máximo a los 3 días de incubación, la masa miceliar fue abundante y el grado de autólisis alcanzado fue del 55%.

Toda la fase autolítica se desarrolla a pH ácido, después de un descenso inicial se mantiene constante.

Las sustancias reductoras y las proteínas se mantienen en niveles constantes durante la fase de autólisis.

Los valores obtenidos para las actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa fueron muy dispares de una muestra a otra.

Los resultados están representados en la tabla IV.

III.6.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Cunninghamella echinulata.

El peso máximo se alcanzó a los 4 días de incubación, siendo el crecimiento abundante en estas condiciones. El grado de autólisis alcanzado por este hongo fue del 49%.

Las sustancias reductoras no desaparecen totalmente del medio y las proteínas van aumentando en el transcurso de la fase autolítica.

La actividad poligalacturonasa aumenta durante los primeros días de pérdida de peso seco, descendiendo rápidamente hasta su total inactivación. Los valores más altos de actividad polimetilgalacturonasa se detectaron en plena autólisis, descendiendo ligeramente al final del proceso.

Los resultados se encuentran representados en la ta-bla V.

Los hongos estudiados que pertenecen a la clase Zygomycetes presentan un comportamiento similar en cuanto al pH de la fase autolítica que es ácido, mientras que los pertenecientes a la clase Deuteromycetes presentan un pH en la fase degradativa ligeramente alcalino.

III.7.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Trichoderma viride.

El peso máximo fue obtenido a los 5 días de incubación, el grado de autólisis alcanzado por este hongo fue del 70%, encontrándose el micelio, al final del proceso, más deteriorado que en el resto de los hongos estudiados.

El pH inicial del medio desciende durante la fase de crecimiento hasta valores de 3, que coincide con el día de peso máximo, estos valores aumentan posteriormente, transcurriendo la autólisis a un pH neutro.

Las proteínas aumentan considerablemente en el comienzo de la autólisis, valores que descienden a los pocos días de haberse iniciado esta fase.

Las actividades enzimáticas determinadas fueron bajas en todo el proceso, siendo mayores frente al ácido poligalacturónico que frente a la pectina.

Los resultados se encuentran representados en la tabla VI.

III.8.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Fusarium oxysporum.

El crecimiento de este hongo, en estas condiciones, ha sido lento, alcanzando el peso máximo el día 7 de incubación. El grado de autólisis fue bastante elevado, llegando a valores del 70%.

El pH inicial del medio de 5,5, desciende en la fase de crecimiento hasta 4,6, para sufrir posteriormente un brusco aumento que coincide con el comienzo de la autólisis, desarrollándose ésta a un pH ligeramente alcalino.

Las sustancias reductoras se mantienen constantes igual que los valores de proteínas.

Las actividades enzimáticas frente a pectina y al ácido poligalacturónico fueron muy bajas en ambos casos, siendo muchos días nulas.

Los resultados están representados en la tabla VII.

III.9.- RESULTADOS OBTENIDOS EN *Fusarium culmorum*.

Este hongo alcanzó el peso máximo el día 7 de incubación, el crecimiento del micelio fue abundante y el grado de autólisis no superior al 59%.

Lo mismo que ocurre en *F.oxysporum* la fase autolítica se desarrolla a un pH ligeramente alcalino.

Las actividades enzimáticas poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa fueron muy bajas. En las dos especies de *Fusarium* se encontraron las actividades más bajas frente a estos dos sustratos y en estas condiciones.

Los resultados se encuentran en la tabla VIII.

III.10.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Cladosporium herbarum.

El crecimiento máximo se alcanzó a los 7 días de incubación, la masa miceliar fue abundante y el grado de autolisis alcanzado fue del 55%.

Durante los primeros días, fase de crecimiento, el pH inicial sufrió un descenso para posteriormente subir y mantenerse durante la fase degradativa a un pH ligeramente alcalino.

Las sustancias reductoras disminuyen y sufren un ligero incremento al final del proceso.

La actividad poligalacturonasa fue prácticamente nula en todas las determinaciones, sin embargo, sí presentaba actividad frente a la pectina, la cual aparece en plena autolisis.

Los resultados se encuentran representados en la tabla IX.

III.11.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Cladosporium cucumerinum.

El peso máximo en este hongo fue alcanzado a los 3 días de incubación, siendo el crecimiento abundante y el grado de autolisis alcanzado del 49 %.

El pH del medio es ligeramente alcalino en todo el proceso degradativo.

La actividad frente al ácido poligalacturónico fue

nula en todas las determinaciones, sin embargo hay actividad frente a la pectina que aparece al final del proceso de degradación.

Los resultados se encuentran representados en la tabla X.

III.12.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Helminthosporium halodes.

En estas condiciones de cultivo este hongo alcanzó el peso máximo a los 7 días de incubación y el grado de autólisis fue del 50%.

El pH inicial del medio desciende hasta valores de 3 para subir en la fase autolítica, alcanzándose en las últimas muestras valores de pH ligeramente alcalinos.

Las sustancias reductoras descienden justo con el comienzo de la autólisis.

Los valores de proteínas aumentan durante la fase de degradación.

Las actividades enzimáticas fueron bajas frente a los dos sustratos, siendo mayor frente a la pectina que frente al ácido poligalacturónico.

Los resultados se encuentran representados en la tabla XI.

III.13.- RESULTADOS OBTENIDOS EN Alternaria alternata.

El micelio de este hongo, en las condiciones descritas alcanzó el peso máximo el día 5 de incubación.

Durante los días de crecimiento el pH inicial de 5,5 sufre un descenso, produciéndose posteriormente un incremento que coincide con el comienzo de la fase autolítica, llevándose a cabo todo el proceso a un pH de 6,7, autólisis neutra.

El grado de autólisis alcanzado fue del 43%.

Se observó un descenso de las sustancias reductoras hasta la total desaparición. El nivel de proteínas que desciende en la fase de crecimiento, se mantiene constante en la fase autolítica.

Las actividades enzimáticas poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa fueron encontradas en todas las muestras tomadas, observándose un incremento de las actividades al principio del proceso degradativo. La actividad enzimática frente a la pectina fue mayor que frente al ácido poligalacturónico.

Los resultados están representados en la tabla XII.

TABLA I

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Mucor rouxii

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS	SUSTANCIAS REDUCTORAS	PROTEINAS	PG	PMG
----- días	----	-----	----- %	----- μmol/ml	----- mg/ml	----- mU/ml	----- mU/ml
5	3,5	52,0	-	2,40	0,38	170,3	101,2
6	3,6	69,3	0,0	2,28	0,43	156,5	91,1
7	3,5	65,7	5,2	1,64	0,60	73,4	76,6
13	4,1	44,0	36,5	0,42	0,59	51,3	17,7
20	4,2	35,8	48,3	0,11	0,59	43,7	23,3
27	4,4	36,3	47,7	0,10	0,65	39,8	16,9
34	4,3	31,3	54,9	0,08	0,68	32,6	23,5
41	4,4	30,8	55,3	0,0	0,60	28,3	27,0
48	4,5	29,1	58,1	0,0	0,57	0,0	0,0
54	4,5	29,1	58,1	0,0	0,62	0,0	0,0

TABLA I I

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Rhizopus stolonifer.

PERIODO DE INCUBACION días	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
4	3,5	40,1	-	0,21	0,12	26,6	40,0
5	3,6	54,0	-	0,38	0,24	13,3	3,3
6	3,5	57,4	0,0	0,38	0,26	24,5	19,9
7	3,8	46,7	18,6	0,50	0,26	43,6	0,0
13	4,0	39,1	31,1	0,0	0,27	2,6	0,0
20	4,0	39,1	31,9	0,07	0,23	15,5	0,0
27	4,1	37,2	35,2	0,07	0,31	0,0	0,0
34	4,0	37,4	34,8	0,21	0,27	24,5	37,0
41	4,0	37,0	35,5	0,14	0,21	21,4	0,0

TABLA III

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Rhizopus arrhizus

PERIODO DE INCUBACION días	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
3	3,0	53,4	-	0,29	0,29	0,0	0,0
4	3,2	56,1	0,0	0,21	0,14	75,2	51,7
5	3,6	54,4	3,0	0,21	0,14	47,0	0,0
6	3,2	45,1	19,6	0,21	0,33	32,0	24,9
13	3,2	37,4	33,3	0,14	0,22	21,4	26,8
20	3,2	35,6	36,5	0,07	0,21	11,1	14,4
27	3,3	34,8	38,0	0,14	0,27	2,6	37,9
34	3,4	31,9	43,1	0,29	0,28	124,1	47,1
41	3,4	31,0	44,7	0,07	0,22	0,0	16,7
48	3,4	32,0	43,0	0,57	0,27	4,4	7,4

TABLA IV

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Cunninghamella elegans

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
----- días	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	2,9	97,5	0,0	0,50	0,23	0,0	0,0
4	3,4	88,9	8,8	0,35	0,18	34,6	34,6
13	3,3	69,1	29,1	0,29	0,20	23,9	0,0
20	3,4	59,2	39,3	0,07	0,19	0,0	0,0
27	3,5	57,8	40,7	0,14	0,21	17,0	0,0
34	3,8	58,6	39,9	0,14	0,27	74,9	23,6
41	3,8	58,2	40,3	0,14	0,25	0,0	0,0
48	3,8	44,6	54,3	0,14	0,25	1,4	0,0
55	3,8	44,5	54,3	0,14	0,21	0,0	0,0

TABLA V

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Cunninghamella echinulata.

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
----- días	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	3,1	76,2	-	0,28	0,19	20,7	8,3
4	3,1	83,9	0,0	0,21	0,27	21,3	17,0
5	3,2	83,0	1,1	0,19	0,19	59,8	0,0
6	3,5	73,2	12,8	0,33	0,29	16,6	0,0
13	3,8	54,9	34,6	0,07	0,43	5,4	0,0
20	4,0	49,7	40,8	0,29	0,30	14,4	50,0
27	4,2	48,9	41,7	0,24	0,32	0,0	40,0
34	4,4	48,6	42,1	0,03	0,28	6,9	36,8
41	4,0	42,7	49,2	0,17	0,30	0,0	0,0
48	4,6	43,5	48,2	0,04	0,25	0,0	12,5

TABLA VI

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Trichoderma viride.

PERIODO DE INCUBACION días	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS μmol/ml	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
3	3,6	45,1	-	11,13	0,63	0,0	0,0
5	3,0	68,0	0,0	0,21	1,06	14,1	0,7
6	3,3	64,6	5,0	0,14	1,23	14,5	5,8
13	4,4	34,1	49,9	0,07	0,55	2,2	0,0
20	5,0	38,3	43,7	0,14	0,38	11,2	28,1
27	5,6	34,5	49,3	0,29	0,45	52,0	13,4
34	7,2	28,6	58,0	0,07	0,35	9,0	0,0
41	6,0	27,8	59,1	0,29	0,38	8,1	9,3
48	6,1	19,6	71,2	0,0	0,29	0,0	19,1
55	6,2	19,6	71,2	0,14	0,39	14,0	7,3

TABLA VII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Fusarium oxysporum

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS	SUSTANCIAS REDUCTORAS	PROTEINAS	PG	PMG
días			%	$\mu\text{mol/ml}$	mg/ml	mU/ml	mU/ml
6	4,6	54,1	-	0,57	0,23	0,0	0,0
7	4,6	58,2	0,0	0,42	0,51	0,0	0,0
8	5,0	48,0	17,5	0,42	0,38	0,0	0,0
13	8,0	47,3	18,7	0,42	0,29	5,3	0,0
20	8,2	45,6	21,6	0,14	0,41	0,0	0,0
27	8,0	42,0	27,8	1,42	0,23	15,7	0,0
34	7,7	27,4	52,9	0,14	0,38	0,0	40,3
41	7,9	27,4	52,9	0,42	0,38	0,0	0,0
48	7,7	26,7	54,2	0,35	0,38	8,9	1,6
55	7,7	17,2	70,4	0,42	0,47	24,8	21,8

TABLA VIII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Fusarium culmorum

PERIODO DE INCUBACION ----- días-----	PH ----	PESO mg/muestra -----	GRADO DE AUTOLISIS % -----	SUSTANCIAS REDUCTORAS μmol/ml -----	PROTEINAS mg/ml -----	PG mU/ml -----	PMG mU/ml -----
6	6,7	60,0	-	0,55	0,12	0,0	0,0
7	6,5	75,6	0,0	0,37	0,22	0,0	0,0
8	5,6	70,4	6,9	0,35	0,25	2,3	5,7
13	7,1	66,7	11,8	0,50	0,28	0,0	0,0
20	7,5	30,8	59,3	0,64	0,33	0,0	0,0
27	7,1	32,7	56,7	0,21	0,51	3,4	0,0
34	7,5	32,7	56,7	0,17	0,35	2,0	39,2
41	7,2	36,6	51,6	0,71	0,50	1,5	0,0
48	7,5	31,8	57,9	0,35	0,37	6,4	15,2
55	7,5	33,9	55,2	0,35	0,35	0,0	0,0

TABLA IX

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Cladosporium herbarum

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
días							
3	5,2	49,2	-	21,86	0,29	0,0	0,0
5	4,8	71,3	-	16,00	0,36	0,0	0,0
7	5,0	105,5	0,0	1,54	0,25	0,0	0,0
8	7,6	100,0	5,2	0,84	0,33	0,0	0,0
13	7,6	90,4	14,3	0,64	0,21	0,0	0,0
20	7,9	92,1	12,7	0,29	0,23	0,0	0,0
27	7,8	77,2	26,8	0,21	0,46	2,6	69,5
34	7,6	77,2	26,8	0,21	0,19	0,0	56,0
41	7,7	71,5	32,2	0,11	0,18	0,0	65,0
48	7,6	57,8	45,2	0,50	0,23	10,1	26,2
55	7,6	46,6	55,8	0,50	0,23	0,0	0,0

TABLA X

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Cladosporium cucumerinum

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS	SUSTANCIAS REDUCTORAS	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
días	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
2	5,5	62,6	-	20,43	0,29	0,0	0,0
3	5,2	101,1	0,0	9,50	0,30	0,0	0,0
4	5,8	99,5	1,6	3,57	0,29	0,0	0,0
13	7,6	64,4	36,3	0,50	0,36	0,0	0,0
20	7,1	64,2	36,5	0,24	0,28	3,7	0,0
27	7,1	57,6	43,1	0,23	0,29	0,0	0,0
34	7,2	68,3	32,2	0,21	0,25	0,0	42,8
41	7,6	51,0	49,6	0,11	0,21	0,0	71,7
48	7,2	55,0	45,6	0,57	0,25	8,9	27,7
55	7,2	51,0	49,6	0,07	0,21	9,3	11,5

TABLA XI

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE Helminthosporium halodes

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/ml	PMG mU/ml
----- días	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
3	4,7	24,1	-	23,42	0,45	0,0	0,0
5	3,6	64,1	-	16,28	0,51	0,0	0,0
7	3,0	92,1	0,0	1,32	0,50	0,0	0,0
8	3,2	79,8	13,4	0,28	0,59	0,0	0,0
13	3,2	66,4	27,9	0,43	0,62	1,4	0,8
20	5,6	60,0	34,9	0,29	0,45	0,0	13,9
27	5,9	49,2	46,4	0,07	0,81	1,7	40,7
34	7,6	49,2	46,6	0,10	0,40	37,1	95,6
41	7,1	54,5	40,9	0,01	0,43	6,9	20,8
48	7,6	46,5	49,8	0,36	0,51	1,3	11,7
55	7,6	46,5	49,8	0,29	0,45	0,0	0,0

TABLA XII

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS DETERMINACIONES DE *Alternaria alternata*

PERIODO DE INCUBACION ----- días	PH -----	PESO mg/muestra -----	GRADO DE AUTOLISIS % -----	SUSTANCIAS REDUCTORAS μmol/ml -----	PROTEINAS mg/ml -----	PG mU/ml -----	PMG mU/ml -----
3	5,0	52,5	-	0,14	0,70	0,0	0,0
4	3,0	81,0	0,0	0,12	0,74	13,6	0,0
5	3,5	76,1	6,0	0,09	0,72	18,0	40,0
13	5,0	51,4	36,5	0,00	0,59	42,1	81,3
20	6,5	52,7	34,9	0,00	0,66	54,3	82,4
27	6,7	48,0	40,7	0,00	0,66	39,7	53,4
34	6,8	46,8	42,2	0,00	0,33	40,7	82,1
41	6,9	46,2	43,0	0,00	0,51	27,1	52,3
48	6,7	46,3	42,8	0,00	0,39	28,5	24,8
55	6,5	46,0	43,2	0,00	0,57	17,3	15,1

TABLA XII b

RESULTADOS OBTENIDOS PARA Alternaria alternata*

PERIODO DE INCUBACIÓN ----- días-----	PESO		PESO		GRADO DE		SUSTANCIAS		PROTEINAS mg/ml.
	EXP.	TIPO	MEDIA	DS	CV	AUTOLISIS	PH	REDUCTORAS	
	mg/muest.		mg/mue.	---	%	%	----	umol/ml	-----
3	52,5		52,5	0,0	-	-	5,5	0,13	0,90
4	81,0		78,0	4,31	5,5	0,0	3,1	0,12	0,70
5	76,1		75,3	1,2	1,6	3,5	3,4	0,06	1,15
13	51,4		56,5	4,8	8,6	27,6	4,8	0,04	0,62
20	52,7		57,2	5,1	8,9	26,7	6,3	0,04	0,63
27	48,0		55,9	7,65	13,7	28,3	6,5	0,01	0,61
34	46,8		54,4	6,58	12,1	30,3	6,8	0,00	0,36
41	46,2		49,3	2,74	5,6	36,8	7,1	0,00	0,39
48	46,3		47,7	1,78	3,7	38,8	6,5	0,00	0,32
55	46,0		43,2	2,46	5,7	44,6	6,6	0,00	0,44

* media de tres experimentos realizados en el medio con glucosa.

TABLA XII b(continuación)

RESULTADOS OBTENIDOS PARA Alternaria alternata *

PERIODO DE INCUBACION días	PG mU/mg	PMG mU/mg	PL mU/mg	PAL mU/mg	1, 3-B-GLUCANASA mU/mg
4	19,2	17,3	0,79	0,59	0,0
5	18,0	40,0	0,21	0,00	0,0
13	57,1	85,7	1,47	0,50	31,7
20	54,3	75,9	1,83	0,38	27,7
27	45,4	55,1	2,64	0,79	61,8
34	43,5	82,0	2,14	1,56	229,6
41	31,2	50,1	3,92	3,10	128,8
48	36,8	59,7	7,94	6,25	138,2
55	29,2	50,4	2,20	5,50	141,0

* Media de tres experimentos realizados en el medio con glucosa.

III.14.- ELECCION DEL HONGO Alternaria alternata.

A partir de los resultados anteriormente expuestos y representados en las tablas I - XII, hemos elegido en nuestro estudio al hongo Alternaria alternata, por ser aquel que presentaba unas actividades poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa más altas en relación con la fase de autólisis.

III.15.- INDUCCION DE ENZIMAS PECTICAS EN LA AUTOLISIS DE Alternaria alternata.

Con objeto de obtener un rendimiento mayor en las actividades enzimáticas que degradan sustancias pécticas, seguimos el procedimiento clásico de inducir las añadiendo pectina al medio.

El medio de cultivo utilizado fue Czapeck-Dox, suplementado con extracto de levadura, descrito en el apartado "Materiales y Métodos", en el cual la fuente de carbono fue parcial o totalmente sustituida por pectina, en concentraciones que fueron desde 0,25 hasta un 1% de pectina, con el propósito de observar que concentración era la más adecuada para la inducción de éstas actividades.

Los medios obtenidos fueron denominados: medio I, medio II, medio III, medio IV, en los que la proporción de pectina es de 0,25, 0,50, 0,75, y 1% respectivamente.

III.16.- PARAMETROS ESTUDIADOS EN LAS MUESTRAS DE Alternaria alternata EN CULTIVOS CON PECTINA EN EL MEDIO.

Se prepararon 4 medios con proporciones de pectina distintas y en ellos se determinaron los siguientes parámetros:

- pH del medio.
- Grado de autólisis.
- Sustancias reductoras.
- Proteínas.
- Actividades enzimáticas:

Poligalacturonasa

Polimetilgalacturonasa

Pectatoliasa

Pectinliasa

Actividad endo, frente a poligalacturonato
sódico.

Actividad endo, frente a pectina

1,3- β -glucanasa

Invertasa

Amilasa

Celulasa

Fosfatasa ácida

Fosfatasa alcalina

1,3-4- β -glucanasa

1,6- β -glucanasa

Dextranasa

Quitinasa.

Los resultados obtenidos están representados en las tablas siguientes.

TABLA XIII

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO I PARA Alternaria alternata *

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS	SUSTANCIAS REDUCTORAS	PROTEINAS	PG	PMG	PL	PAL
----- días	----	-----	----- %	----- μmol/ml	mg/ml	mU/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg
5	3,2	64,1	0,0	0,52	0,57	543,0	332,5	4,0	3,8
6	6,0	62,0	3,3	0,30	0,48	570,0	380,0	8,0	6,0
13	6,2	61,4	4,2	0,28	0,48	643,1	476,2	11,6	6,1
20	6,7	55,0	14,2	0,21	0,40	839,3	640,5	10,9	6,3
27	6,8	53,1	17,2	0,00	0,28	1182,2	749,3	11,6	9,0
34	6,5	53,1	17,2	0,00	0,33	972,1	697,3	15,7	8,9
41	6,9	45,3	29,5	0,14	0,36	847,3	538,4	13,1	7,4
48	7,0	39,2	38,9	0,00	0,35	714,3	374,2	10,3	5,9
55	6,9	34,5	46,2	0,00	0,35	243,5	110,5	20,3	8,4

* los datos representados son la media de tres experimentos

TABLA XIII (continuación)

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO I PARA Alternaria alternata

PERIODO DE INCUBACION	DISMINUCION		DISMINUCION		1,3- β GLUCANASA mU/mg	INVERTASA		AMILASA mU/mg	CELULOSA		FOSFATASA ACIDA mU/mg
	viscosidad pect. U/mg	viscosidad poliga. U/mg	viscosidad pect. U/mg	viscosidad poliga. U/mg		mU/mg	mU/mg		mU/mg	mU/mg	
5	248,1	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	250,0	50,2	50,1	50,1	
13	56,9	100,8	44,2	79,4	44,2	79,4	377,0	69,4	57,0	57,0	
20	166,7	58,5	121,4	187,5	121,4	187,5	491,1	74,4	65,5	65,5	
27	377,6	580,6	224,8	714,3	224,8	714,3	578,2	85,0	136,1	136,1	
34	784,3	180,2	119,8	191,3	119,8	191,3	303,0	72,2	72,2	72,2	
41	469,7	204,7	227,1	405,1	227,1	405,1	522,5	59,5	46,3	46,3	
48	474,2	62,4	367,3	619,0	367,3	619,0	442,2	68,0	51,0	51,0	
55	664,2	0,0	405,8	129,3	405,8	129,3	312,9	68,0	23,8	23,8	

TABLA XIV

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO II PARA Alternaria alternata*

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/mg	PMG mU/mg	PL mU/mg	PAL mU/mg
días	---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
5	3,1	68,7	0,0	0,61	0,50	798,6	241,1	8,2	6,0
6	6,0	65,0	5,4	0,48	0,46	800,5	600,5	10,5	3,4
13	7,0	63,4	7,7	0,28	0,37	832,0	672,0	15,0	8,5
20	7,2	53,0	22,9	0,38	0,35	956,4	759,2	15,2	9,3
27	7,5	50,1	27,1	0,00	0,26	1288,9	716,1	23,7	12,3
34	7,7	47,1	31,4	0,00	0,34	814,4	241,5	19,5	9,9
41	8,1	41,6	39,4	0,28	0,41	634,9	191,2	17,4	7,3
48	8,0	38,0	44,7	0,00	0,32	405,4	143,0	12,3	9,4
55	7,3	34,7	49,5	0,00	0,34	316,6	118,2	16,3	9,6

* los datos representados son la media de tres experimentos.

TABLA XIV (continuación)

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO II PARA Alternaria alternata

PERIODO DE INCUBACION días	DISMINUCION		DISMINUCION		1,3- β GLUCANASA mU/mg	INVERTASA		AMILASA mU/mg	CELULASA		FOSFATASA ACIDA mU/mg
	VISCOSIDAD pect. U/mg	VISCOSIDAD polig. U/mg	VISCOSIDAD polig. U/mg	VISCOSIDAD polig. U/mg		mU/mg	mU/mg		mU/mg	mU/mg	
5	79,1	0,0	0,0	0,0	0,0	80,0	150,2	40,1	50,1		
13	104,0	45,8	23,9	127,5	23,9	99,7	186,6	48,3	57,9		
20	206,3	50,7	599,1	324,1	127,5	151,7	566,7	90,5	29,3		
27	776,3	294,1	332,0	287,5	324,1	512,8	613,6	119,1	50,4		
34	845,4	294,1	332,0	287,5	320,9	154,1	504,2	70,0	31,5		
41	649,0	332,0	287,5	287,5	287,5	104,5	453,0	46,5	43,6		
48	388,9	233,9	307,9	307,9	307,9	52,1	468,8	74,4	33,5		
55	280,8	0,0	347,5	347,5	347,5	0,0	574,2	70,0	66,5		

TABLA XV

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO III PARA Alternaria alternata*

PERIODO DE INCUBACION	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/mg	PMG mU/mg	PL mU/mg	PAL mU/mg
----- días	----	-----	-----	----- $\mu\text{mol/ml}$	-----	-----	-----	-----	-----
5	3,4	68,0	0,0	1,00	0,58	531,2	459,8	6,9	4,4
6	6,2	64,1	5,8	0,80	0,58	630,0	550,0	8,0	6,0
13	6,8	64,0	5,9	0,35	0,32	1083,5	737,1	13,8	11,7
20	7,3	63,2	7,1	0,35	0,35	913,1	274,6	21,0	10,3
27	7,8	38,3	43,4	0,00	0,24	770,6	177,8	25,6	10,0
34	8,0	39,0	42,6	0,00	0,22	450,2	83,3	25,8	16,6
41	8,2	36,0	47,1	0,21	0,33	460,5	99,8	15,9	8,4
48	8,0	40,3	40,7	0,00	0,31	227,5	75,3	10,0	5,8
55	8,0	38,7	43,1	0,00	0,32	297,6	81,8	12,8	10,2

* los datos representados son la media de tres experimentos.

TABLA XV (continuación)

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO III PARA Alternaria alternata

PERIODO DE INCUBACION	DISMINUCION VISCOSIDAD	DISMINUCION VISCOSIDAD	1,3- β GLUCANASA	INVERTASA	AMILASA	CELULASA	FOSFATASA
----- días-----	pect. U/mg	polig. U/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg
5	87,2	0,0	0,0	100,0	200,0	40,0	21,0
13	103,6	0,0	44,2	122,8	241,8	40,9	29,8
20	595,8	176,5	263,8	78,2	268,7	37,4	13,6
27	1246,6	754,0	276,6	39,7	327,4	39,7	49,6
34	750,4	134,8	357,1	27,0	692,6	75,8	64,9
41	744,7	222,1	434,8	14,4	299,4	39,7	25,3
48	456,7	70,5	373,7	34,6	276,5	49,9	30,7
55	286,8	0,0	506,0	22,3	312,5	40,9	29,8

TABLA XVI

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO IV PARA Alternaria alternata *

PERIODO DE INCUBACION días	PH	PESO mg/muestra	GRADO DE AUTOLISIS %	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml}$	PROTEINAS mg/ml	PG mU/mg	PMG mU/mg	PL mU/mg	PAL mU/mg
5	3,1	76,1	0,0	0,81	0,38	914,8	680,5	10,8	9,8
6	6,2	72,0	5,4	0,70	0,30	945,0	750,0	13,5	10,0
13	7,0	70,0	8,0	0,53	0,29	990,1	834,2	17,5	11,6
20	7,7	68,5	9,9	0,42	0,36	793,7	341,3	11,7	11,1
27	8,1	47,2	38,0	0,00	0,27	455,2	122,5	17,0	8,0
34	8,3	41,4	45,6	0,00	0,22	443,7	183,9	22,5	13,7
41	8,1	39,1	48,6	0,35	0,33	203,8	110,9	10,6	8,4
48	8,0	40,4	46,9	0,00	0,31	110,0	75,3	11,5	7,6
55	8,0	32,1	57,8	0,00	0,32	126,5	47,6	11,1	9,0

* los datos representados son la media de tres experimentos.

TABLA XVI (continuación)

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MEDIO IV PARA Alternaria alternata

PERIODO DE INCUBACION	DISMINUCION VISCOSIDAD	DISMINUCION VISCOSIDAD	1,3- β GLUCANASA	INVERTASA	AMILASA	CELULASA	FOSFATASA
----- días-----	pect. U/mg	polig. U/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg	mU/mg	ACIDA mU/mg
5	0,0	0,0	0,0	25,0	100,0	20,1	2,2
13	202,8	77,9	62,4	33,1	185,2	23,1	6,6
20	599,9	142,8	95,2	17,6	220,5	57,3	30,9
27	1105,1	730,3	236,3	37,9	259,7	70,3	43,3
34	1082,2	415,3	270,6	104,6	212,8	28,9	14,4
41	712,3	124,9	349,3	15,4	153,6	49,4	26,9
48	129,6	0,0	358,6	14,9	130,2	16,6	26,0
55	217,4	0,0	446,4	14,0	130,0	16,6	26,0

Las tablas anteriores ponen de manifiesto las variaciones de los parámetros estudiados en cuatro medios de cultivo con concentraciones de pectina diferentes.

Haciendo una media de las actividades a lo largo de todo el proceso autolítico obtenemos los siguientes resultados:

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	MEDIO DE CULTIVO				
	I	II	III	IV	
Poligalacturonasa	728	760	707	554	mU/mg
Polimetilgalactur.	478	458	371	380	mU/mg
Pectatoliasa	7	8	9	10	mU/mg
Pectinliasa	12	14	16	13	mU/mg
Endo (pectina)	405	416	534	506	U/mg
Endo (ac. polig.)	148	194	170	186	U/mg

Hemos elegido el medio II como el más adecuado para la obtención y posterior estudio del complejo enzimático de A.alternata.

El complejo enzimático se obtuvo por precipitación con ácido tánico. En la tabla XVII comparamos las actividades obtenidas en este proceso con las actividades de proteínas precipitadas con acetona y las actividades del líquido de cultivo.

TABLA XVII

PURIFICACIÓN PARCIAL DE LAS PROTEÍNAS EXISTENTES EN EL LIQUIDO DE CULTIVO POR PRECI-

PITACION CON ACIDO TANICO Y ACETONA.

	LIQUIDO DE CULTIVO				PRECIP.CON TANICO				PRECIP.CON ACETONA			
	mg%		%		mg%		%		mg%		%	
Proteínas	38,5		36		14,0		36		14,0		36	
Act.esp.	28,4	1094	100	1	61,2	857	78	2,2	68,0	952	87	2,4
Act.tot.	76,7	2953	100	1	119,1	1668	57	1,6	136,1	1906	65	1,8
Puri.	2,8	108	100	1	5,6	78	72	2,0	12,1	169	156	4,3
(1)	0,0	0	0		2,6	37			3,4	48		
ENDO-POLIG.	351,3	13525	100	1	476,2	6667	49	1,4	321,8	4505	33	0,9
ENDO-PECT.	922,7	35.124	100	1	2003,8	28053	79	2,2	1748,3	24476	69	1,9

(1) La actividad específica está representada en mU/mg para PG, PMG, PAL, y PL; y en U/mg para las dos actividades endo.

III.17.- PRESENCIA DE ACTIVIDAD HIDROLITICA Y ACTIVIDAD LIASICA EN EL COMPLEJO ENZIMATICO.

Hemos investigado con ácido tiobarbitúrico los productos de la reacción entre el complejo enzimático y los sustratos, con el fin de determinar si estaba implicada una poligalacturonasa o una pectatoliasa, o bien una polimetilgalacturonasa o una pectinliasa cuando actuaban sobre poligalacturonato sódico o pectina respectivamente.

El tiempo de incubación fue de tres horas a 37°C.

Cuando utilizamos pectina como sustrato obtenemos un pico de absorción a 510 nm., lo que nos indica la presencia de una polimetilgalacturonasa y un pequeño pico entre 547 y 550 nm. correspondiente a una pectinliasa.

Utilizando como sustrato poligalacturonato sódico se observa un comportamiento paralelo pero las actividades son menores (fig.7).

El complejo enzimático de A.alternata presenta por lo tanto ambos tipos de actividades. El comportamiento similar sobre los dos sustratos nos hace pensar en la posible presencia de una galacturonasa y una liasa que son activas frente a los dos sustratos.

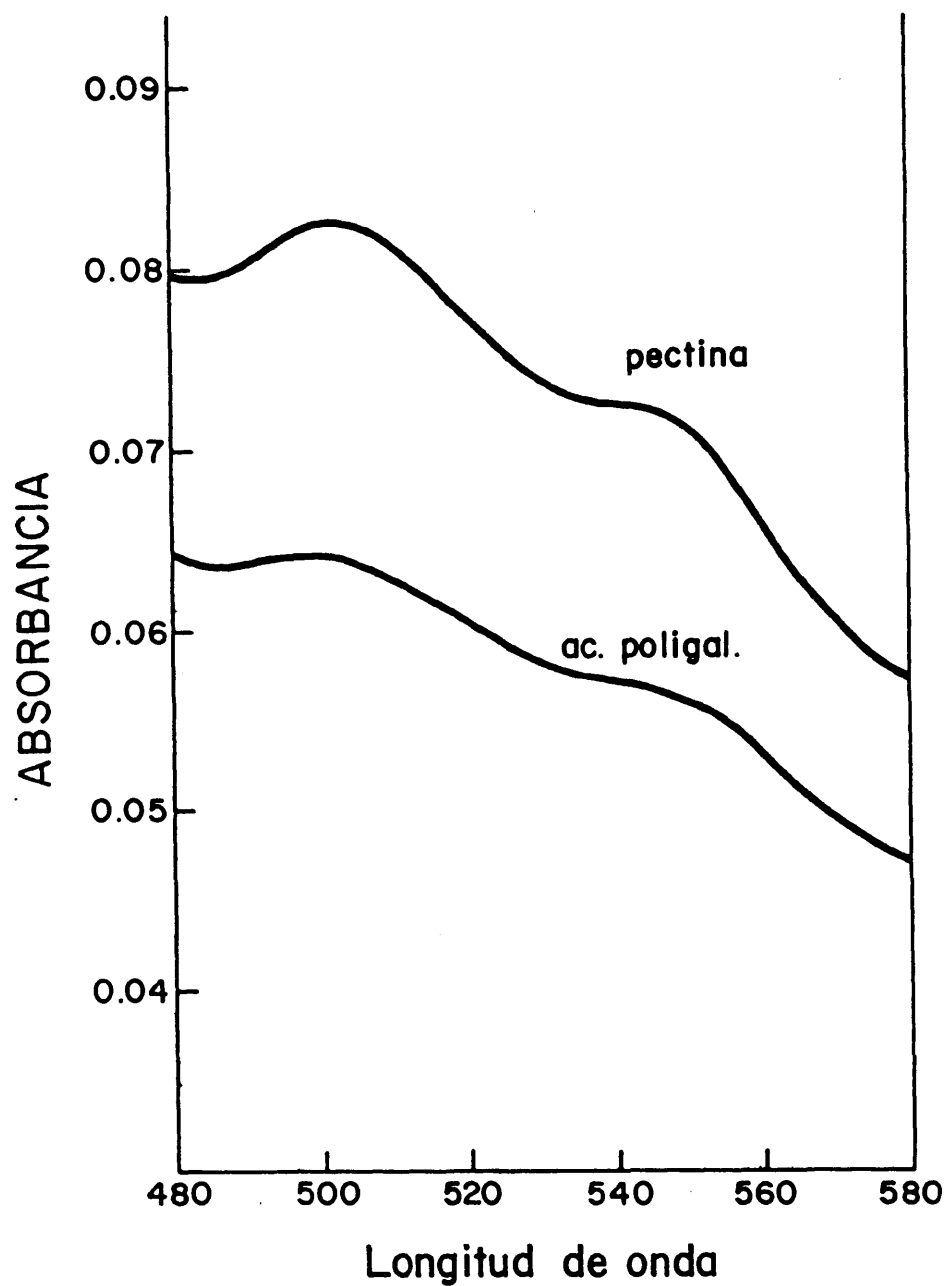


Fig. 7 .- Espectro de absorción en el test del ácido tiobarbitúrico de los productos de la degradación de la pectina y el poligalacturonato sódico por el complejo enzimático de A.alternata.

III.18.- PRESENCIA DE ACIDO GALACTURONICO EN LAS PAREDES Y
LIQUIDO DE CULTIVO DE A.alternata.

Hemos estudiado la posible presencia de ácido galacturónico en los líquidos de cultivo así como en el micelio de A.alternata en medios de cultivo sin pectina y con pectina como fuentes de carbono.

La detección del ácido galacturónico se hizo por cromatografía en papel de los hidrolizados de paredes y líquido metabólico según el método descrito por Warren (1960).

Los resultados obtenidos en cultivos autolizados están representados en la siguiente tabla:

<u>LIQUIDO METABOLICO</u>		<u>PAREDES</u>	
<u>sin pectina</u>	<u>con pectina</u>	<u>sin pectina</u>	<u>con pectina</u>
-----	-----	-----	-----
++	++++	+	+

La presencia de ácido galacturónico en las paredes del hongo fue la misma tanto en cultivos que llevaban pectina y glucosa en el medio como en los que llevaban solamente glucosa.

Sin embargo el análisis cromatográfico de los hidro

lizados del líquido metabólico nos revela que la cantidad de ácido galacturónico presente en el medio con pectina es el doble, pudiendo provenir de la pectina hidrolizada. En el medio sin pectina es interesante resaltar la presencia de ácido galacturónico producido por el propio hongo y que podría estar relacionado con la inducción de enzimas pécticas.

III.19.- CARACTERISTICAS CINETICAS DE LAS ENZIMAS PECTICAS
DEL HONGO Alternaria alternata.

Los estudios cinéticos se realizaron en los precipitados proteínicos, parcialmente purificados, de cultivos autolizados de A.alternata en el medio II.

III.19.1.- POLIGALACTURONASA.

a) PH OPTIMO.

Sustrato: Poligalacturonato sódico a una concentración final de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM , de diferentes valores de pH.

Tiempo de incubación 10 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

pH	Lectura	Activ.relativa
	(U.A.)	mU/ml.
3,0	1,30	1805
3,5	1,36	1888
4,0	1,30	1805
4,5	1,27	1763
5,0	1,24	1722
5,5	1,40	1944
6,0	1,29	1791
6,5	1,31	1819

pH	Lectura (U.A.)	Activ.relaliva mU/ml
7,0	1,26	1750
7,5	1,28	1777
8,0	1,26	1750
8,5	1,24	1722
9,0	1,07	1428

PH óptimo de 3,5 y 5,5 . Estos resultados se encuentran representados en la fig.8 .

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a una concentración final de 1 mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 10 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

Volumen de solución de enzima (ul)	Lectura (U.A.)	Activ.relaliva mU/ml
10	0,17	236
20	0,27	375
30	0,39	542
40	0,50	694

Poliagalacturonasa

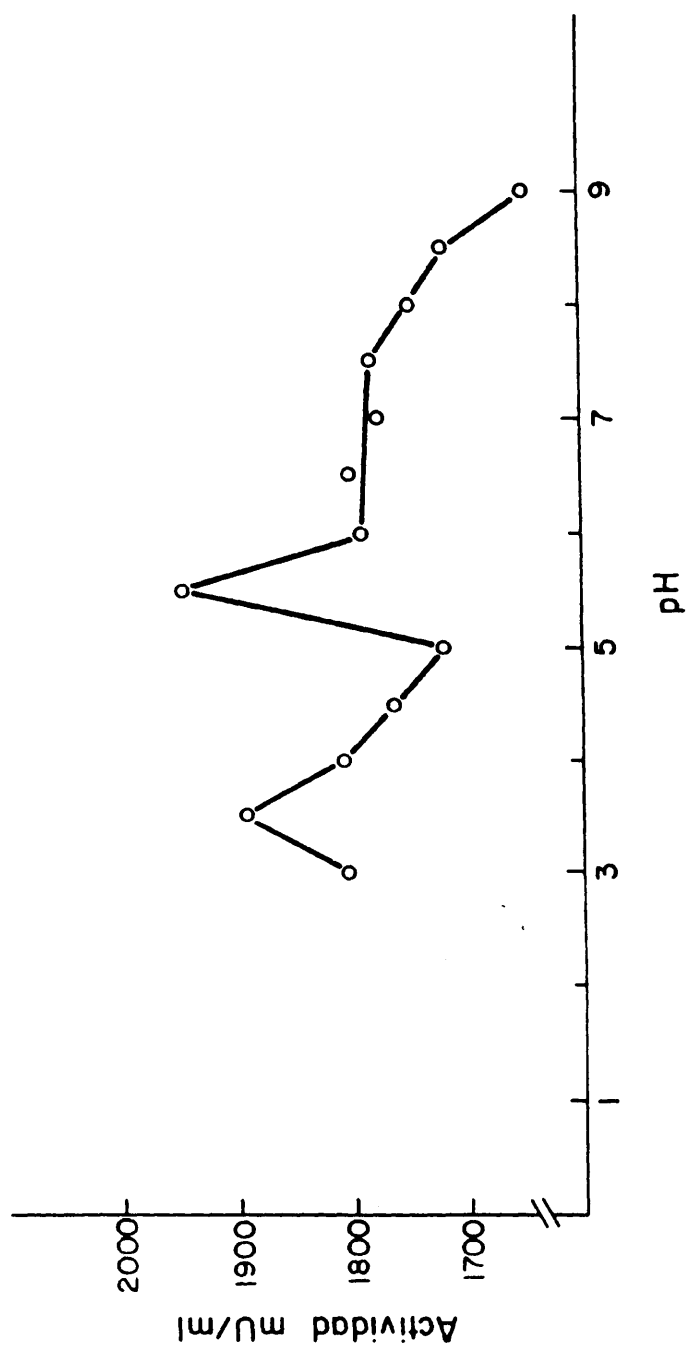


Fig. 8.- Curva de pH óptimo.

<u>Volumen de solución de enzima (μl)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>	<u>Activ.relativa mU/ml</u>
50	0,67	931
60	0,84	1167
70	0,88	1222
80	0,95	1319
90	1,10	1528
100	1,21	1681

Coeficiente de correlación 0,99

La recta de regresión es $y = 76,83 + 16,23x$

Estos resultados se encuentran representados en la fig.9.

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA (Vmax.)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a unas concentraciones finales de 100 a 1900 mg/ml, referido a equivalentes de ácido galacturónico. Estas concentraciones van desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 15 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

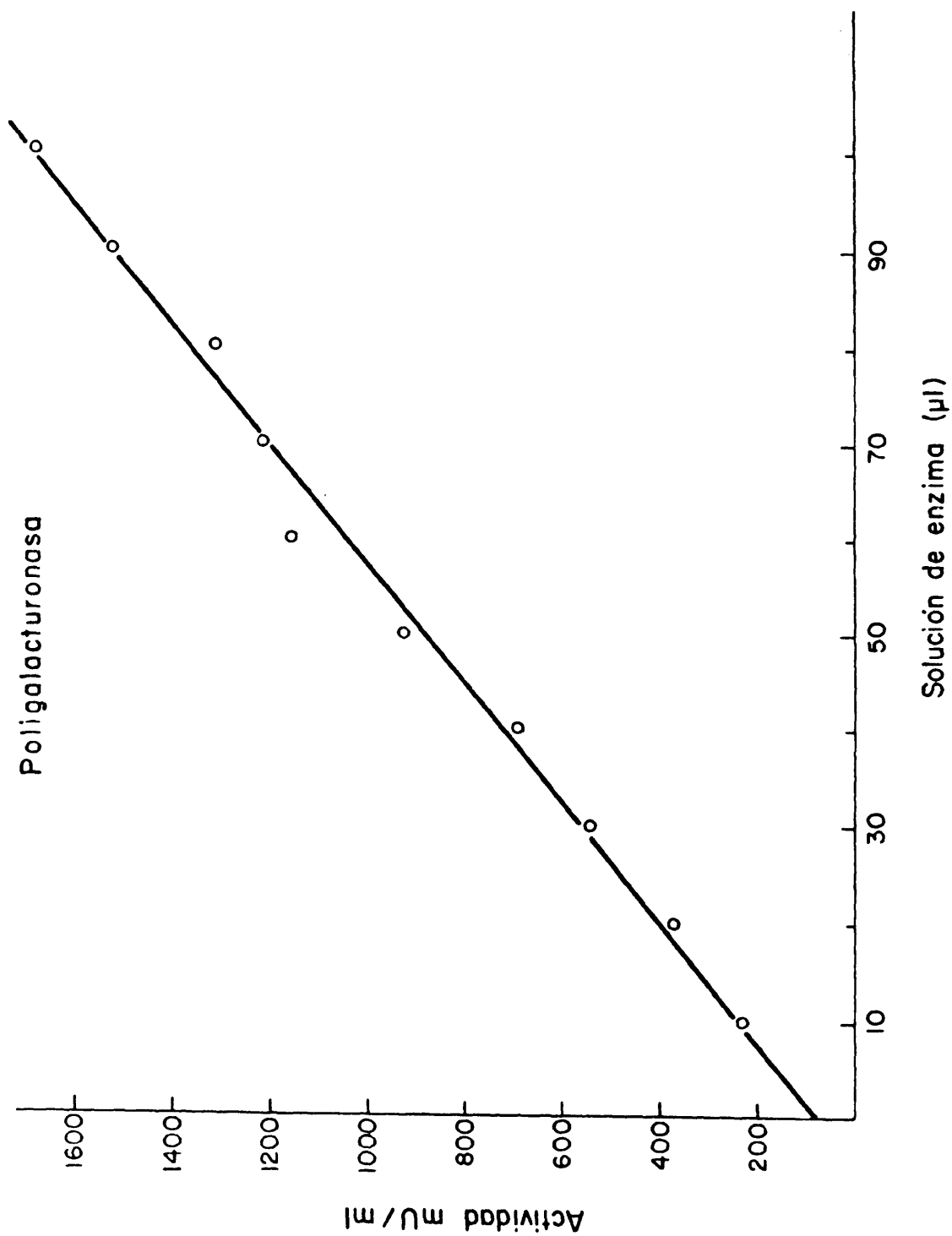


Fig. 9.- Variación de la actividad con la concentración de enzima

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>1/S mM⁻¹</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>	<u>Actividad mU/ml</u>	<u>(1/V).10³ 1/mU/ml.10³</u>
0,51	1,96	0,30	16,65	60,06
1,53	0,64	0,73	40,51	24,68
2,55	0,39	1,05	58,27	17,16
3,57	0,28	1,29	71,59	13,96
4,59	0,22	1,29	71,59	13,96
5,61	0,18	1,44	79,92	12,51
6,63	0,15	1,50	83,25	12,01
7,65	0,13	1,55	86,02	11,61
8,67	0,11	1,58	87,69	11,40
9,69	0,10	1,63	90,46	11,05

Coefficiente de correlación 1,00.

La recta de regresión es $y = 7,81 + 26,52x$

$x = -0,29$ para $y=0$

$K_m = 1/0,29 = 3,45 \text{ mM}$ $V_{max.} = 0,13 \text{ U/ml}$

Estos datos se encuentran representados en la fig.10.

III.19-2.- POLIMETILGALACTURONASA.

a) PH OPTIMO.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concentración final de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM , de diferentes valores de pH.

Poligalacturonasa

$K_m = 3,45 \text{ mM}$

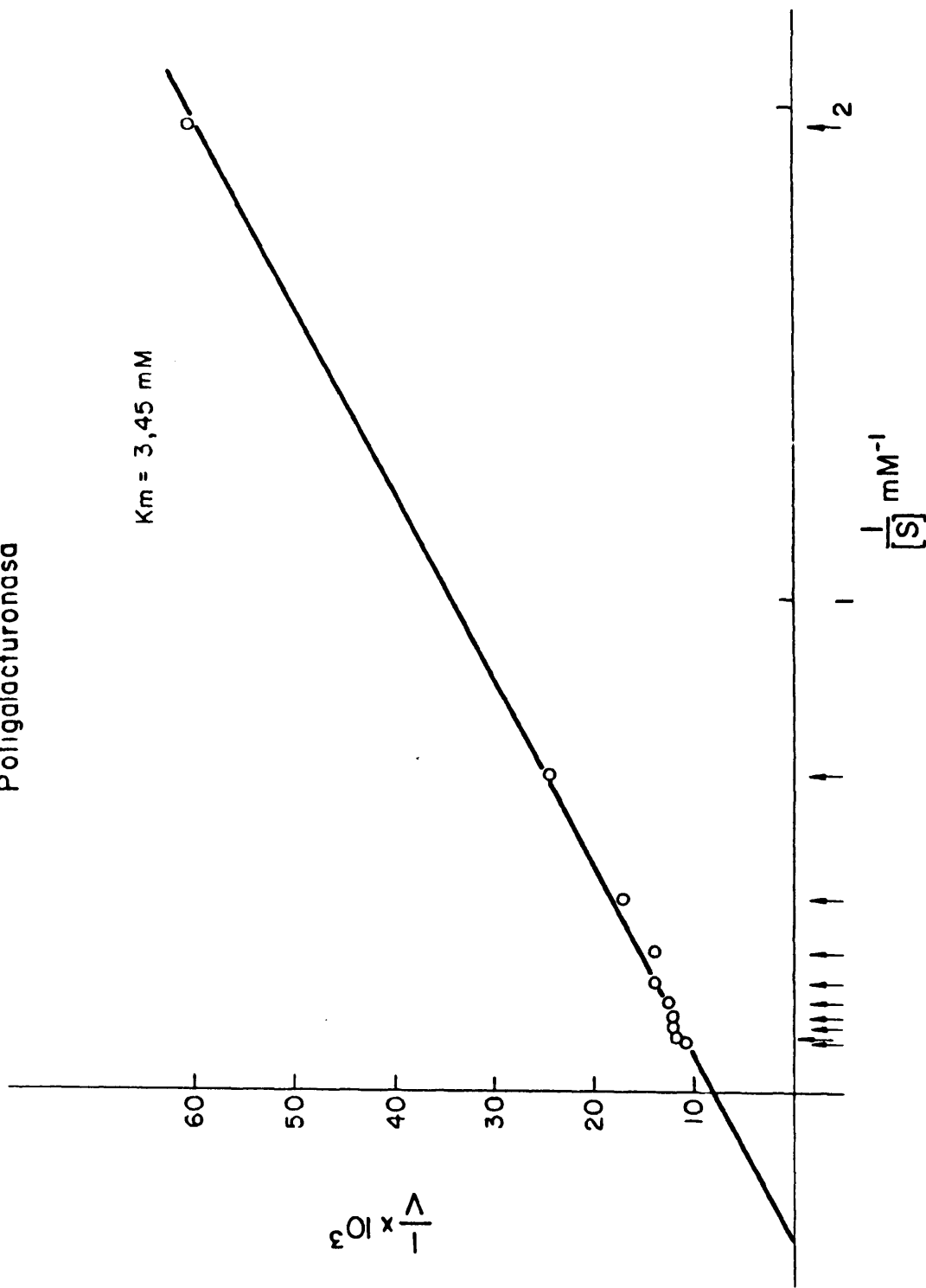


Fig. 10.- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

Tiempo de incubación 10 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>pH</u>	<u>Lectura</u> <u>(U.A.)</u>	<u>Activ.relativa</u> <u>mU/ml</u>
3,0	0,99	1375
3,5	0,98	1361
4,0	0,98	1361
4,5	0,99	1375
5,0	0,99	1375
5,5	1,21	1680
6,0	1,18	1638
6,5	1,16	1611
7,0	1,08	1500
7,5	1,05	1402
8,0	0,99	1375
8,5	0,98	1361
9,0	0,98	1361

El pH óptimo fue de 5,5. Estos resultados se encuentran re
presentados en la fig. 11.

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA
CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concenu

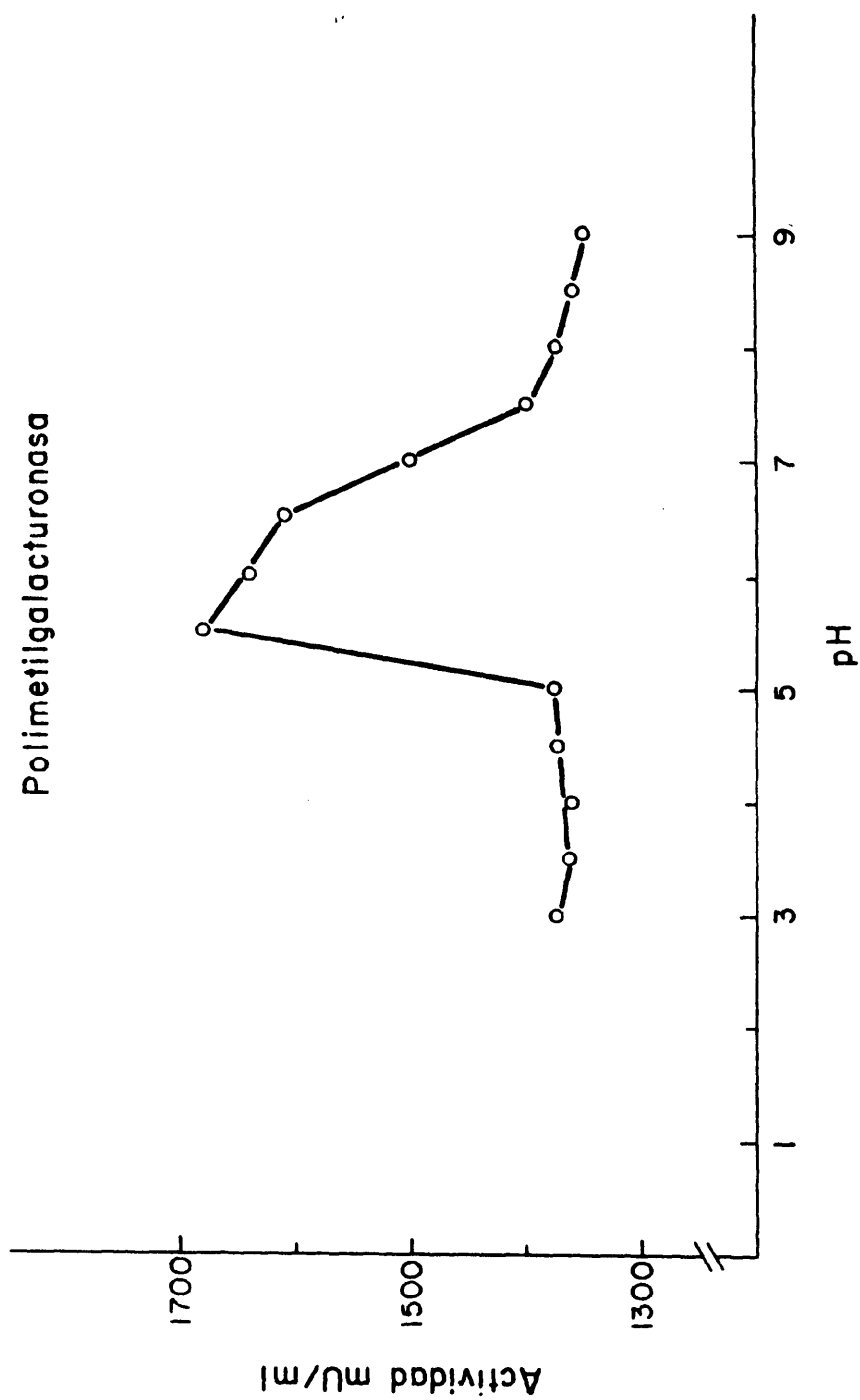


Fig. 11.- Curva de pH óptimo.

tración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 10 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Volumen de solución de enzima (μl.)</u>	<u>Lectura (U.A.)</u>	<u>Activ.relat. mU/ml</u>
10	0,21	292
20	0,29	403
30	0,30	417
40	0,39	542
50	0,48	667
60	0,53	736
70	0,57	792
80	0,59	819
90	0,63	875
100	0,71	986

Coeficiente de correlación 0,98

La recta de regresión es $y = 239,73 + 7,51x$.

Estos datos se encuentran representados en la fig.12.

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA (Vmax)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS- MENTEN (Km).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Pectina de manzana, a concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l, referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 15 minutos a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

Concentración de sustrato (mM)	1/S mM ⁻¹	Lectura (U.A.)	Actividad mU/ml	(1/V).10 ³ 1/mU/ml.10 ³
0,51	1,96	0,32	17,76	56,30
1,53	0,64	0,65	36,07	27,72
2,55	0,39	1,02	56,61	17,66
3,57	0,28	1,05	58,27	17,16
4,59	0,22	1,12	62,50	16,00
5,61	0,18	1,21	67,15	14,89
6,63	0,15	1,15	63,82	15,66
7,65	0,13	1,26	69,93	14,30
8,67	0,11	1,40	77,70	12,87
9,69	0,10	1,47	81,50	12,26

Coefficiente de correlación 0,99.

La recta de regresión es $y = 10,76 + 23,37x$.

$x = -0,46$ para $y=0$

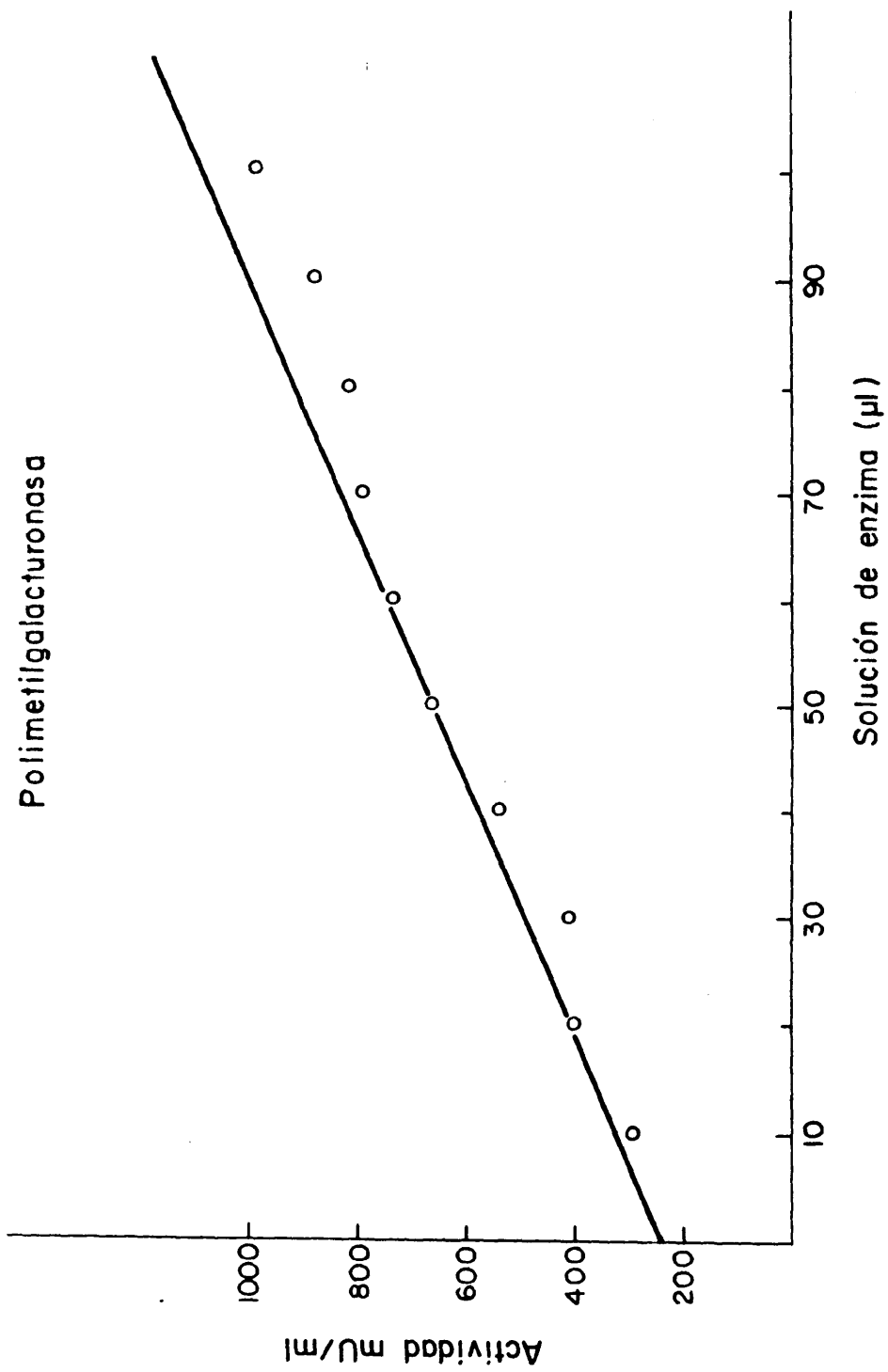


Fig. 12.- Variación de la actividad con la concentración de enzima.

$K_m = 1/0,46 = 2,17 \text{ mM}$ $V_{max.} = 0,09 \text{ U/ml.}$

Estos resultados se encuentran representados en la fig.13.

III.19-3.- PECTATOLIASA.

a) PH OPTIMO.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM de diferentes valores de pH.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

pH	Lectura (U.A.)	Activ.relativa mU/ml
3,0	0,030	6,5
3,5	0,040	8,6
4,0	0,045	9,7
4,5	0,050	10,8
5,0	0,055	11,9
5,5	0,060	13,0
6,0	0,050	10,8
6,5	0,045	9,7
7,0	0,040	8,6
7,5	0,040	8,6
8,0	0,032	6,9

Polimetilgalacturonasa

$K_m = 2,17 \text{ mM}$

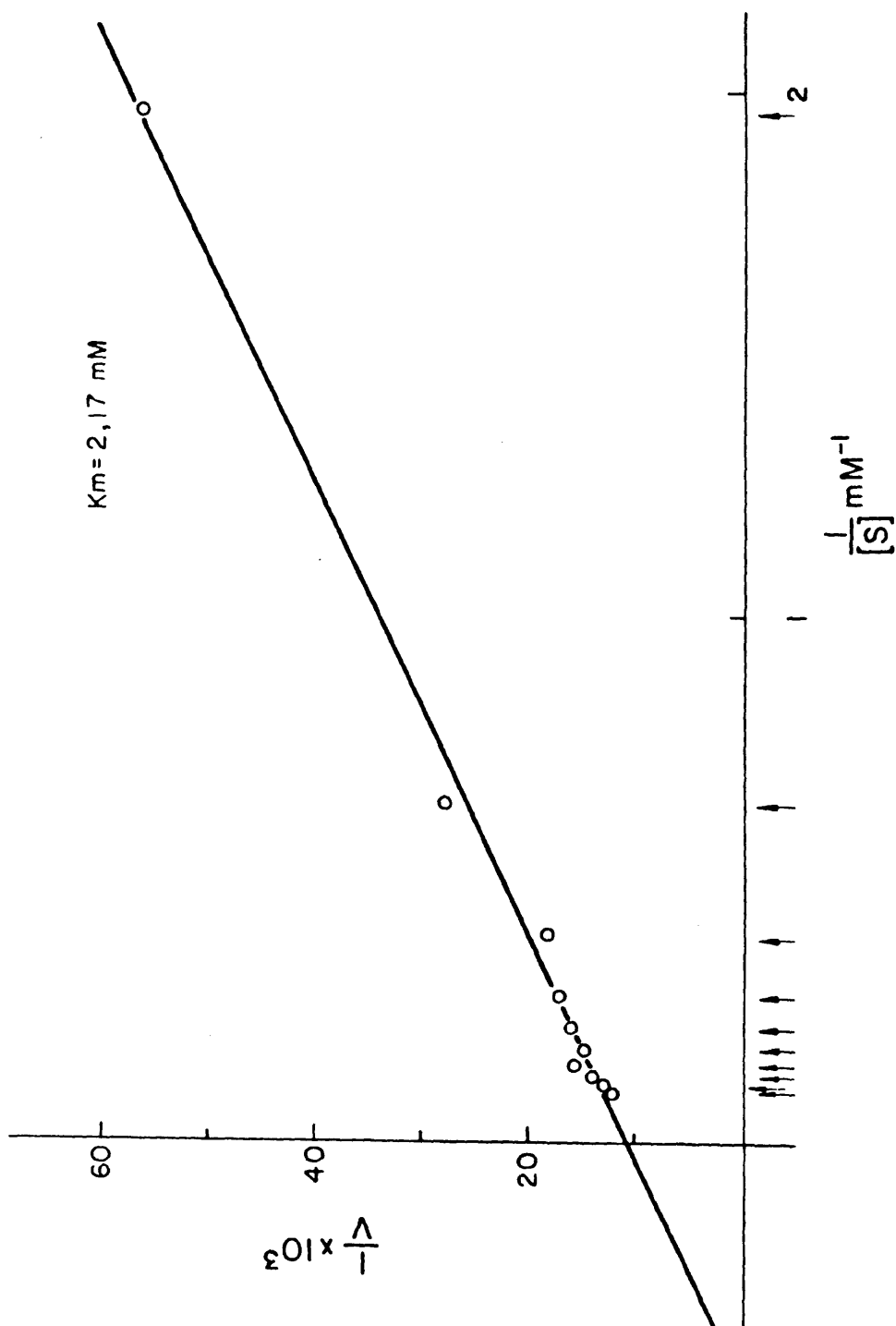


Fig. 13.- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

pH	Lectura* (U.A.)	Activ.relativa mU/ml
8,5	0,00	0,0
9,0	0,00	0,0

* Unidades de absorción que corresponden al incremento entre la lectura inicial y la lectura final.

El pH óptimo fue de 5,5. Estos resultados se encuentran representados en la fig. 14.

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a una concentración final de 1 mg/ml en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

Volumen de solución de enzima (μl.)	Lectura* (U.A.)	Activ.relát. mU/ml
10	0,16	34,7
20	0,22	47,8
30	0,27	58,6
40	0,30	65,2

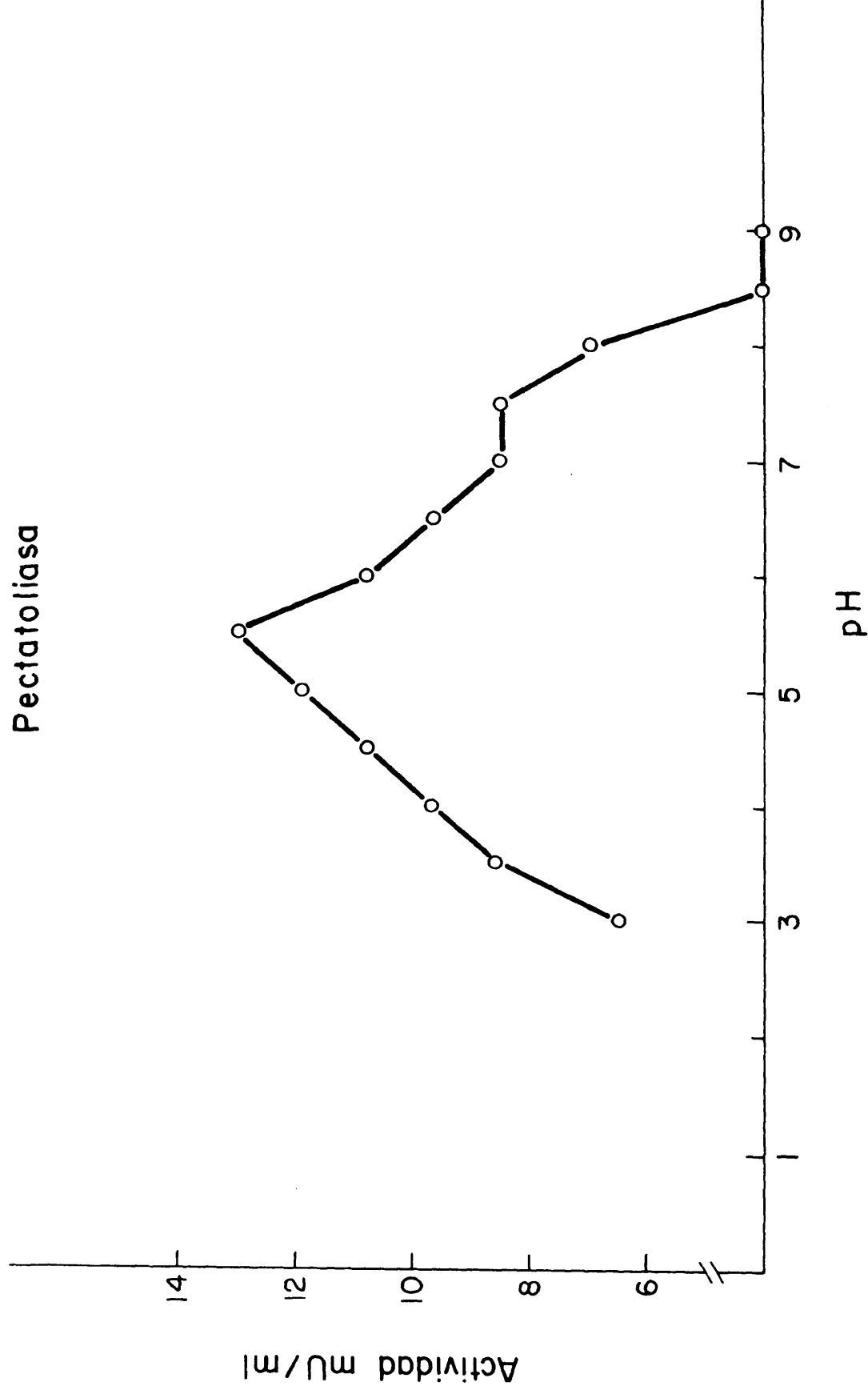


Fig. 14.- Curva de pH óptimo.

<u>Volumen de solución de enzima (ul.)</u>	<u>Lectura* (U.A.)</u>	<u>Activ.relativa mU/ml.</u>
50	0,32	69,5
60	0,32	69,5
70	0,41	89,1
80	0,47	102,1
90	0,46	100,0
100	0,55	119,5

* Unidades de absorción que corresponden al incremento entre la lectura inicial y la lectura final.

Coeficiente de correlación 0,96.

La recta de regresión es $y = 28,34 + 0,86x$.

Estos datos se encuentran representados en la fig.15.

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA (Vmax.)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km.).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a unas concentraciones finales de 100 a 1800 mg/l, referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

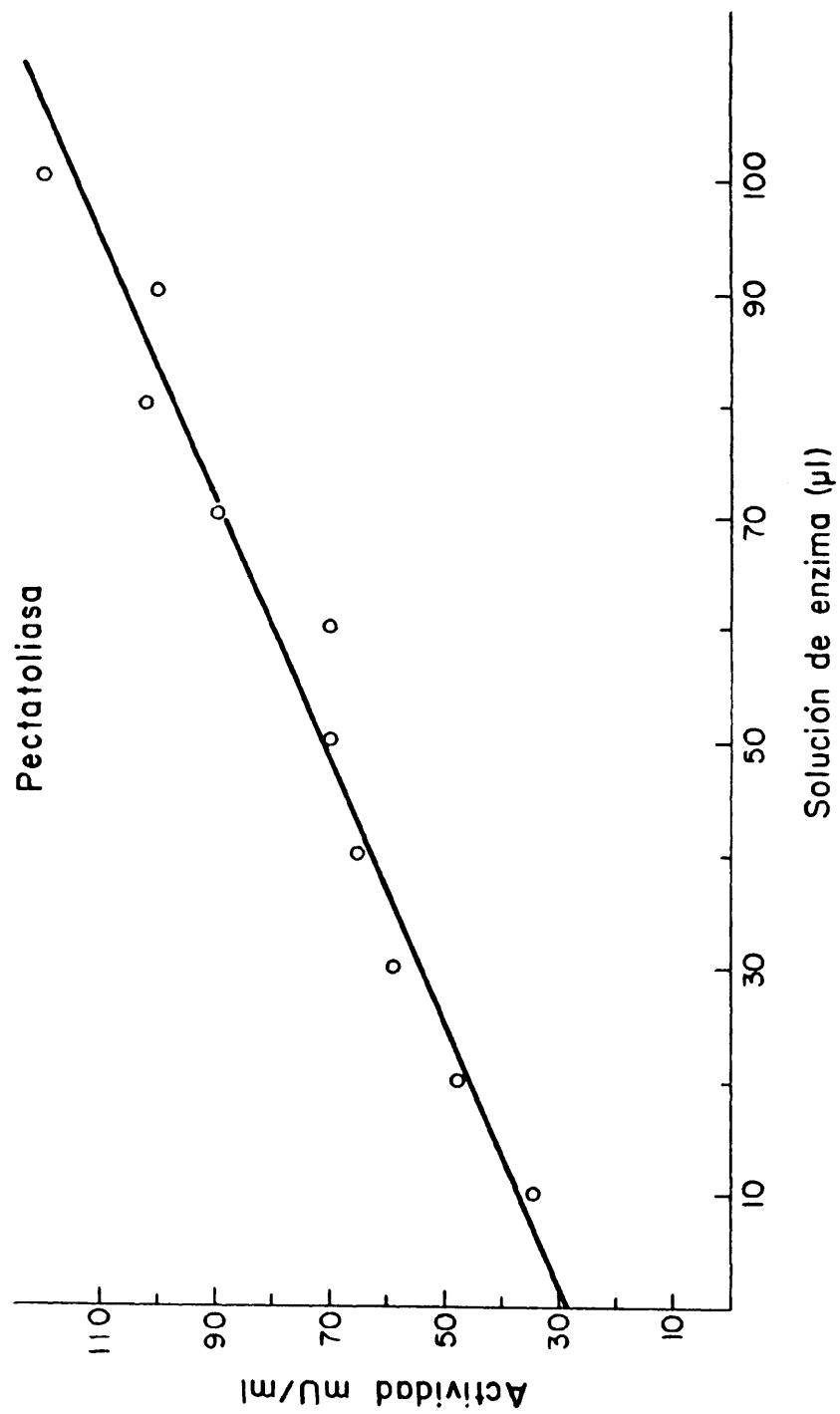


Fig.15.- Variación de la actividad con la concentración de enzima.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>1/S mM⁻¹</u>	<u>Lectura* (U.A.)</u>	<u>Actividad mU/ml</u>	<u>(1/V).10³ 1/mU/ml.10³</u>
0,51	1,96	0,07	15,2	65,78
1,53	0,64	0,12	26,0	38,46
2,55	0,39	0,16	34,7	28,81
3,57	0,28	0,27	58,6	17,06
4,59	0,22	0,34	73,9	13,53
5,61	0,18	0,39	84,7	11,80
6,63	0,15	0,48	100,4	9,96
7,65	0,13	0,53	115,2	8,68
8,67	0,11	0,61	132,6	7,54
9,69	0,10	0,48	100,4	9,96

* Unidades de absorción que corresponden al incremento entre la lectura inicial y la lectura final.

Coeficiente de correlación 0,92

la recta de regresión es $y = 8,06 + 3,48x$.

$x = -0,27$ para $y=0$ $K_m = 1/0,27 = 3,70 \text{ mM}$ $V_{max.} = 0,12 \text{ U/ml}$

Estos datos se encuentran representados en la fig.16.

III.19-4.- PECTINLIASA.

a) PH OPTIMO.

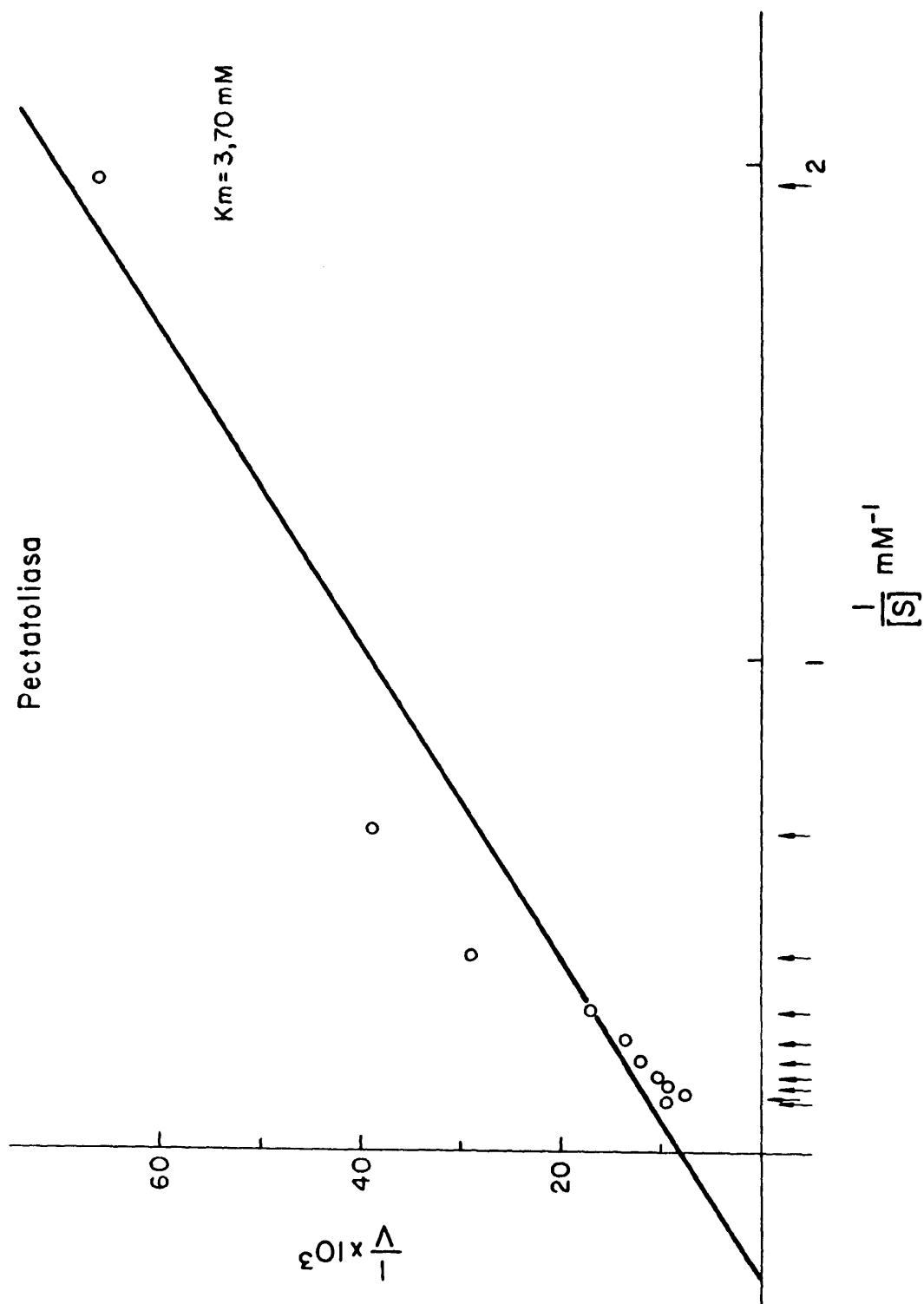


Fig. 16 .- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concentra
ción final de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 50
mM y de diferentes valores de pH.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

pH	Lectura* (U.A.)	Activ.relativa mU/ml
3,0	0,37	80,4
3,5	0,41	89,1
4,0	0,49	106,6
4,5	0,53	115,2
5,0	0,53	115,2
5,5	0,53	115,2
6,0	0,52	113,6
6,5	0,51	110,8
7,0	0,49	106,6
7,5	0,46	100,0
8,0	0,41	89,1
8,5	0,41	89,1
9,0	0,32	70,0

* Unidades de absorción que corresponden al incremento en-
tre la lectura inicial y la lectura final.

El pH óptimo para esta enzima está compren-
dido entre los valores 4,5 y 5,5. Estos resultados se en-

cuentran representados en la fig. 17.

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA
CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concentración final de 1mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Volumen de solución</u> <u>de enzima (μl.)</u>	<u>Lectura*</u> <u>(U.A.)</u>	<u>Activ.relativa</u> <u>mU/ml.</u>
10	0,21	45,6
20	0,30	65,2
30	0,28	60,8
40	0,34	74,0
50	0,43	94,0
60	0,51	110,8
70	0,52	113,0
80	0,53	115,2
90	0,63	136,9
100	0,73	158,6

* Unidades de absorción que corresponden al incremento entre la lectura inicial y la lectura final.

Coefficiente de correlación 0,96.

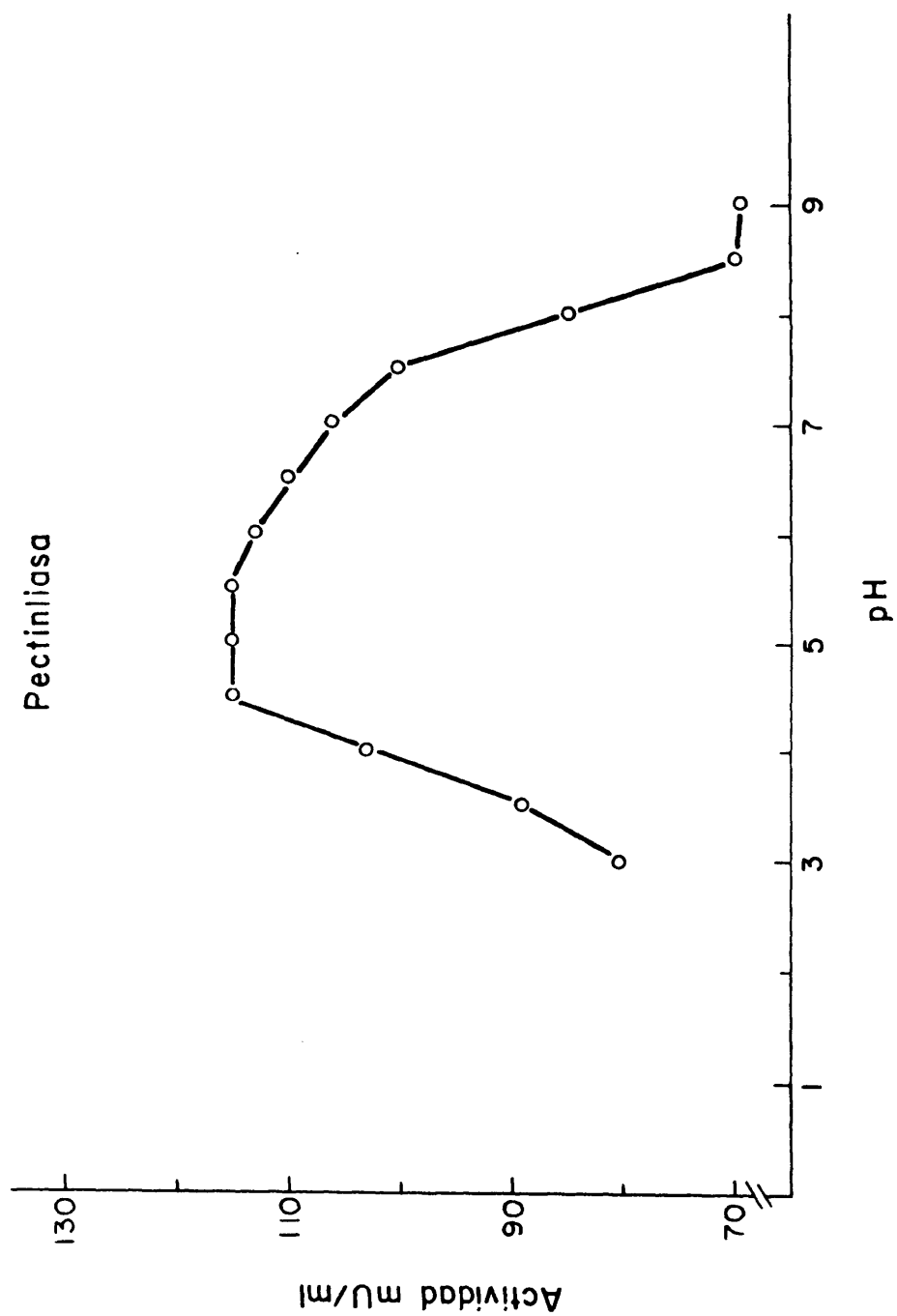


Fig.17.- Curva de pH óptimo.

La recta de regresión es $y = 33,25 + 1,17x$.

Estos datos se encuentran representados en la fig.18

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA (Vmax.)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km.).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Pectina de manzana, a unas concentraciones finales de 100 a 1900 mg/l., referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Concentración de sustrato (mM)</u>	<u>1/S mM⁻¹</u>	<u>Lectura* (U.A.)</u>	<u>Actividad mU/ml</u>	<u>(1/V).10³ 1/mU/ml.10³</u>
0,51	1,96	0,07	15,2	65,78
1,53	0,64	0,17	36,9	27,10
2,55	0,39	0,28	60,8	16,45
3,57	0,28	0,39	84,7	11,83
4,59	0,22	0,50	108,6	9,21
5,61	0,18	0,63	136,9	7,30
6,63	0,15	0,75	163,0	6,13
7,65	0,13	0,82	178,2	5,62
8,67	0,11	0,90	195,6	5,11
9,69	0,10	0,94	204,3	4,89

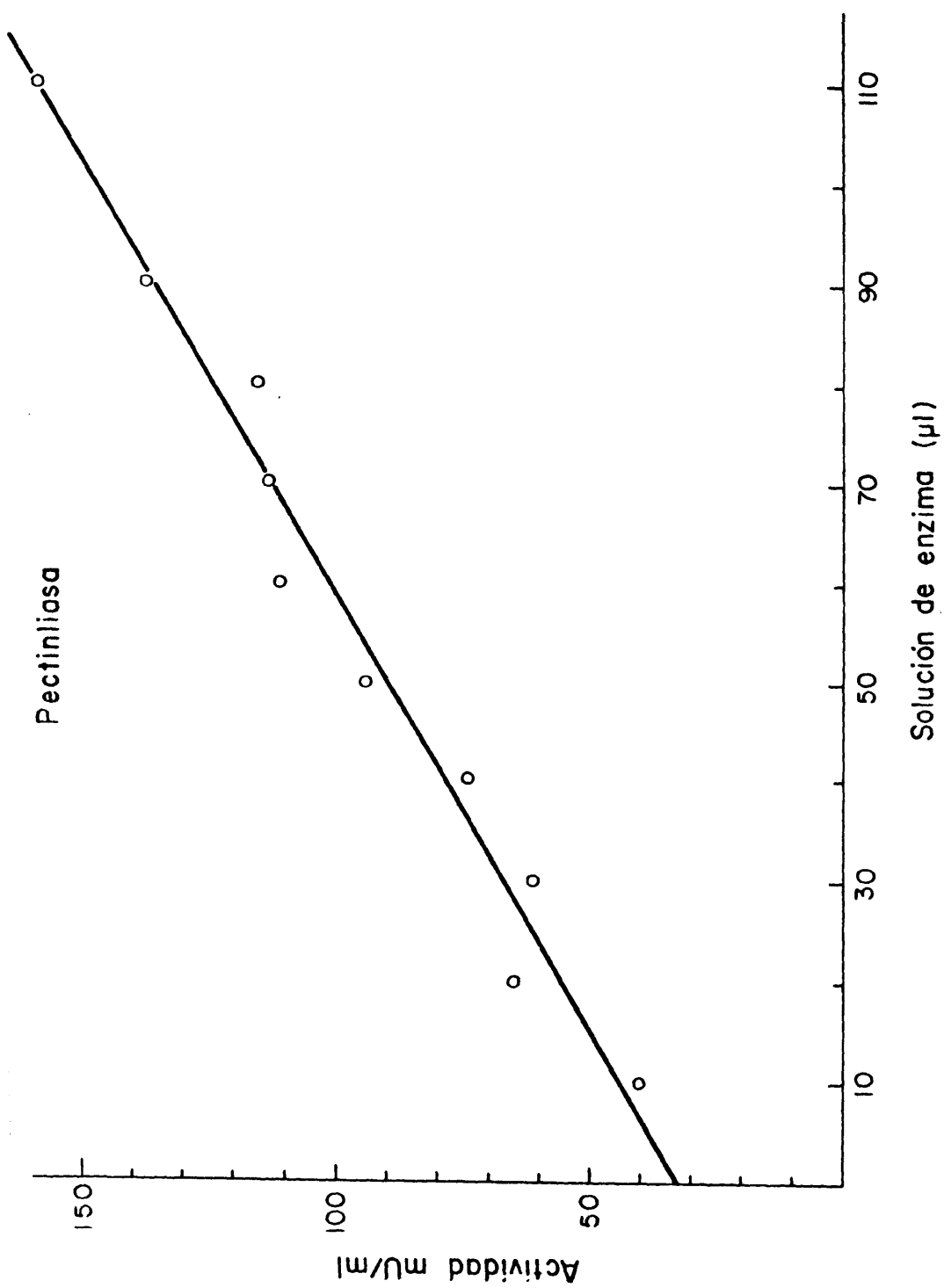


Fig. 18.- Variación de la actividad con la concentración de enzima.

* Lectura que corresponde al incremento entre la lectura inicial y la lectura final.

Coeficiente de correlación 0,99.

La recta de regresión es $y = 2,18 + 33,08x$.

$x = -0,07$ para $y = 0$

$K_m = 1/0,07 = 14,2 \text{ mM}$ $V_{max.} = 0,46 \text{ U/ml.}$

Estos resultados se encuentran representados en la fig.19.

III.19-5.- ACTIVIDAD ENDO FRENTE AL ACIDO POLIGALACTURONICO.

a) PH OPTIMO.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y de diferentes valores de pH.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

pH	Disminución <u>viscosidad</u>	Activ.relativa <u>U/ml</u>
3,0	39"	17,64
3,5	42"	18,83
4,0	45"	20,00
4,5	45"	20,00
5,0	47"	20,88
5,5	37"	16,97

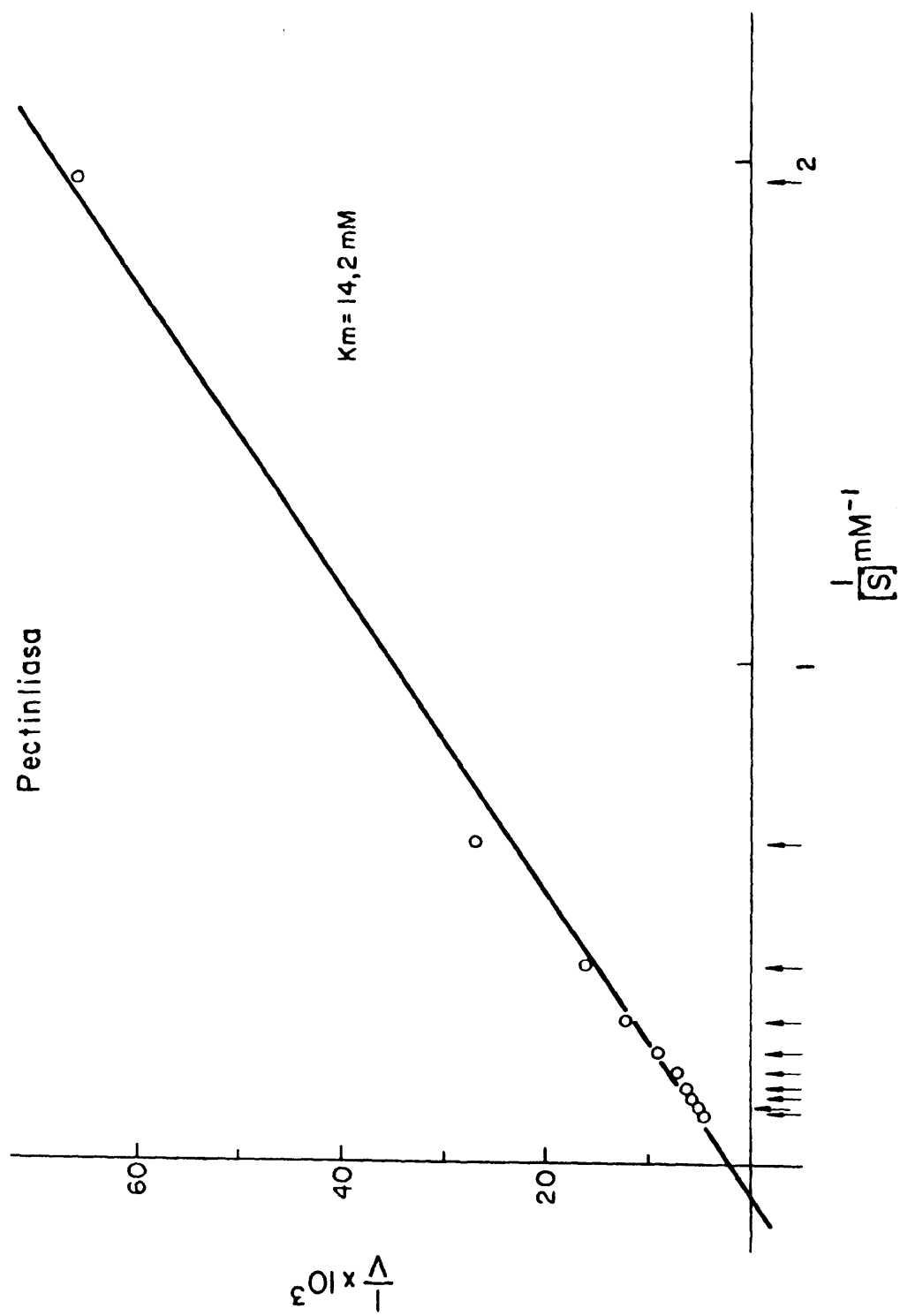


Fig. 19.- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

<u>pH</u>	<u>Disminución viscosidad</u>	<u>Activ.relativa U/ml</u>
6,0	36"	169,8
6,5	27"	130,4
7,0	26"	126,2
7,5	22"	109,4
8,0	19"	79,4
8,5	15"	62,5
9,0	2"	10,8

El pH óptimo fue de 5. Estos resultados se encuentran representados en la fig.20 .

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA
CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Volumen de solución de enzima (µl.)</u>	<u>Disminución viscosidad</u>	<u>Activ.relativa U/ml</u>
10	0"	0,0
20	3"	1,66
30	5"	2,84

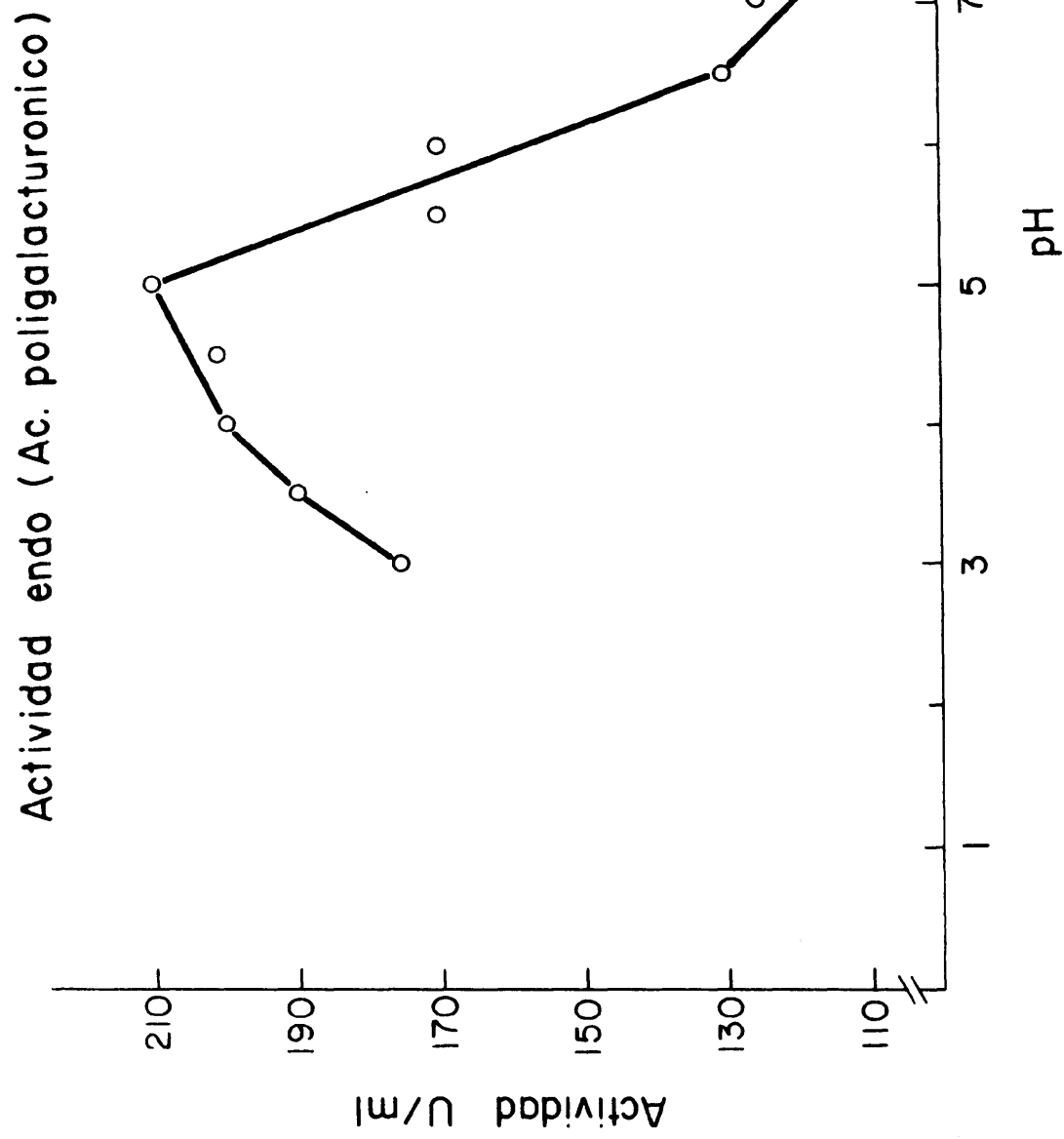


Fig. 20.- Curva de pH óptimo.

<u>Volumen de solución de enzima (ul.)</u>	<u>Disminución viscosidad</u>	<u>Activ.relativa U/ml</u>
40	4"	2,35
50	6"	3,28
60	8"	4,49
70	7"	3,88
80	10"	5,55
90	12"	6,66
100	14"	7,77

Coefficiente de correlación 0,92.

La recta de regresión es $y = -0,01 + 0,07x$.

Estos resultados se encuentran representados en la fig. 21.

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA(Vmax.)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km.).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Poligalacturonato sódico, a concen-
traciones finales de 100 a 1900 mg/l., referido a equiva-
lentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van
desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50
mM y pH5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

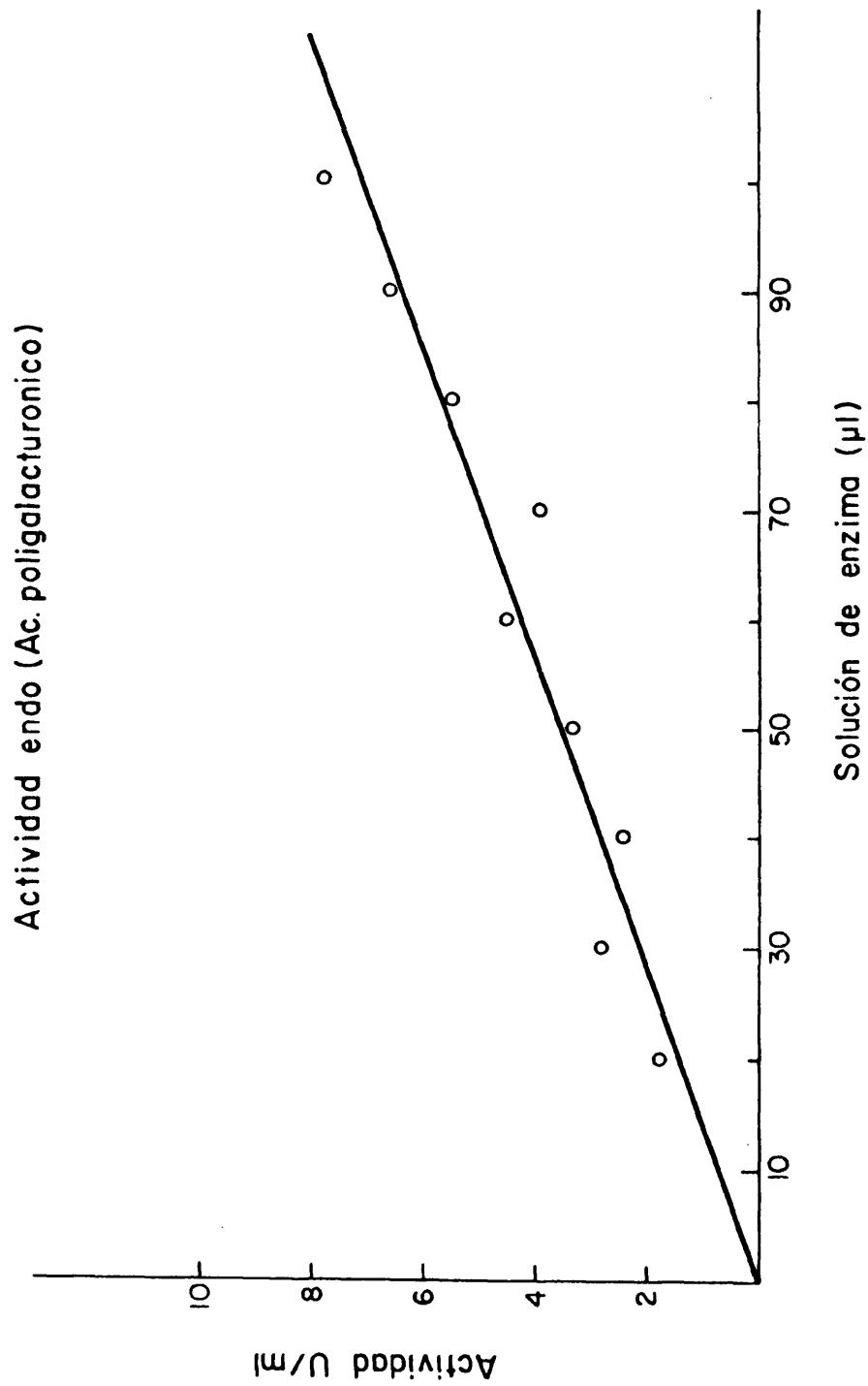


Fig. 21.- Variación de la actividad con la concentración de enzima.

Concentración de sustrato(mM)	1/S mM ⁻¹	Disminución viscosidad	Actividad U/ml	(1/V).10 ³ 1/U/ml.10 ³
0,51	1,96	24"	11,88	84,17
1,53	0,64	30"	14,85	67,84
2,55	0,39	34"	16,80	59,52
3,57	0,28	37"	18,31	54,61
4,59	0,22	38"	18,81	53,16
5,61	0,18	40"	19,80	50,50
6,63	0.15	38"	18,28	54,70
7,65	0,13	42"	19,44	51,44
8,67	0,11	40"	19,80	50,50
9,69	0,10	42"	19,44	51,44

Coeficiente de correlación 0,94.

La recta de regresión es $y = 50,19 + 18,27x$

$x = -2,77$ para $y=0$.

$K_m = 1/2,77 = 0,36\text{mM}$ $V_{\text{max.}} = 20 \text{ U/ml.}$

Estos datos se encuentran representados en la fig.22..

III.19 -6.- ACTIVIDAD ENDO FRENTE A LA PECTINA.

a) PH OPTIMO.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concentración final de 1 mg/ml. en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y de diferentes valores de pH.

Actividad endo (Ac. poligalacturonico)

$K_m = 0,36 \text{ mM}$

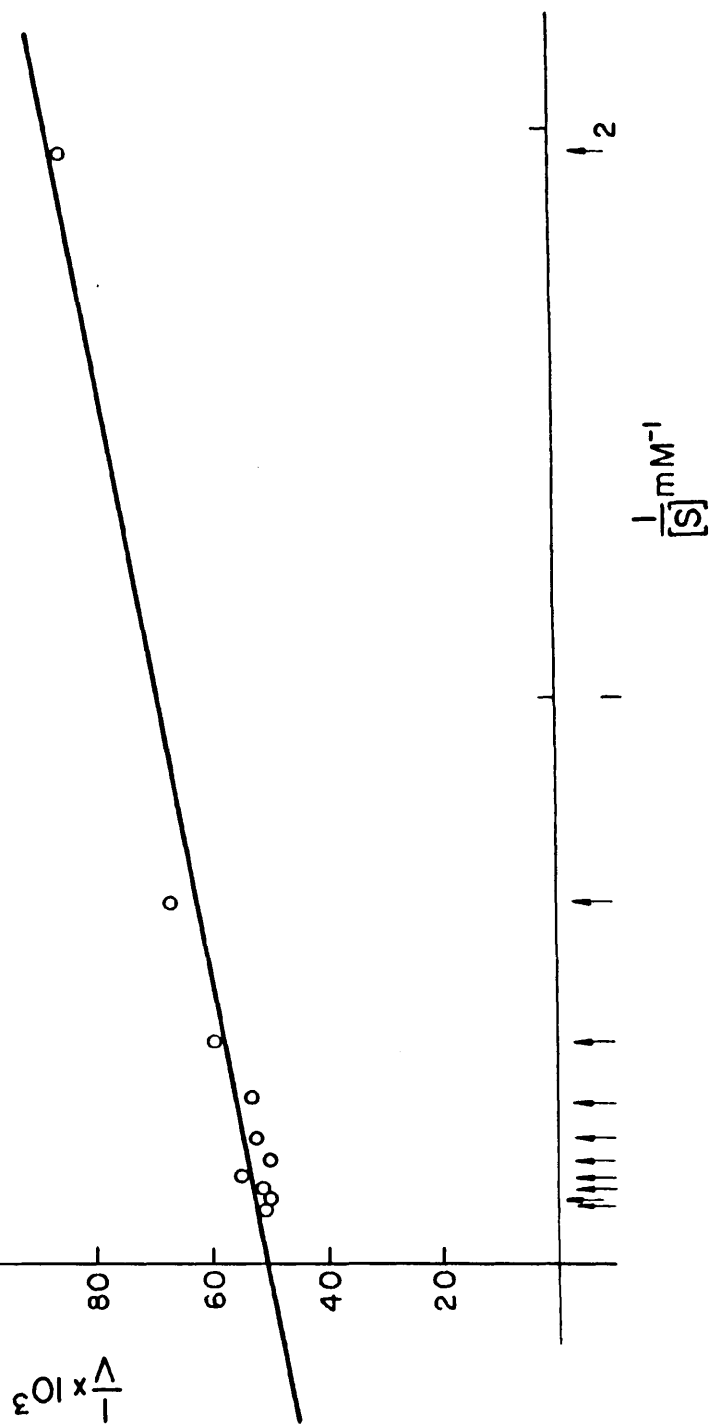


Fig. 22.- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

pH	Disminución <u>viscosidad</u>	Activ.relativa <u>U/ml</u>
3,0	0"	0,0
3,5	0"	0,0
4,0	0"	0,0
4,5	0"	0,0
5,0	1"	0,57
5,5	2"	1,13
6,0	3"	1,71
6,5	1"	0,57
7,0	1"	0,57
7,5	0"	0,0
8,0	0"	0,0
8,5	0"	0,0
9,0	0"	0,0

El pH óptimo fue de 6. Estos resultados se encuentran representados en la fig.23.

b) VARIACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA CON LA
CONCENTRACION DE ENZIMA.

Sustrato: Pectina de manzana, a una concentración final de 1 mg/ml, en tampón citrato-fosfato-borato 50mM

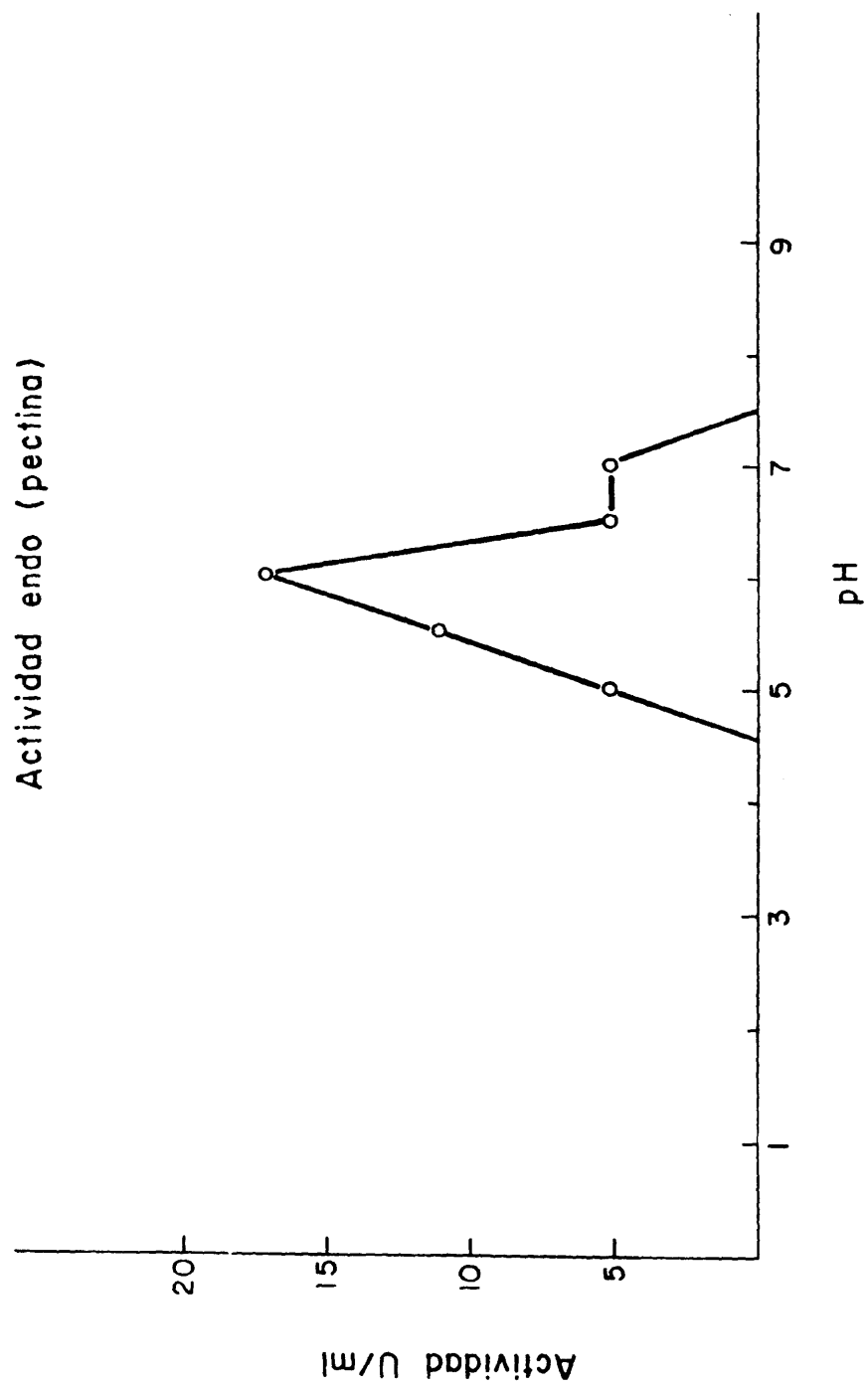


Fig. 23.- Curva de pH óptimo

y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

<u>Volumen de solución enzima (μl.)</u>	<u>Disminución viscosidad</u>	<u>Activ.relativa U/ml</u>
10	5"	2,79
20	5"	2,79
30	5"	2,90
40	6"	3,40
50	9"	5,10
60	11"	6,20
70	13"	7,50
80	16"	9,30
90	19"	10,90
100	23"	11,56

Coeficiente de correlación 0,94.

La recta de regresión es $y = 0,04 + 0,11x$.

Estos resultados se encuentran representados en la fig.24.

c) DETERMINACION DE LA VELOCIDAD MAXIMA (Vmax.)
Y CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (Km.).

Se ha seguido el método de Lineweaver-Burk.

Sustrato: Pectina de manzana, a concentracio-

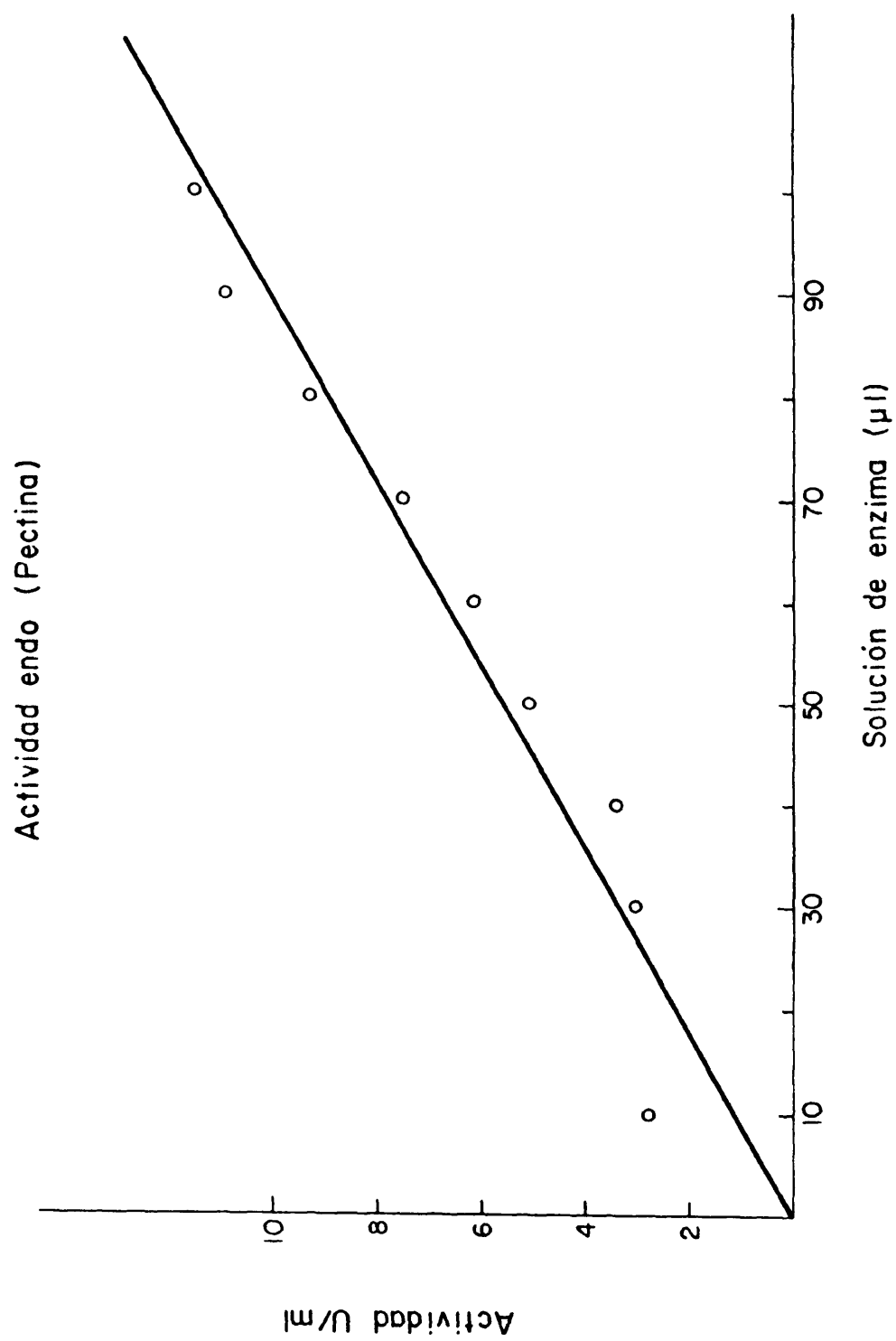


Fig. 24.- Variación de la actividad con la concentración de enzima.

nes finales de 100 a 1900 mg/l. , referido a equivalentes de ácido galacturónico, estas concentraciones van desde 0,51 a 9,69 mM, en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.

Tiempo de incubación 3 horas a 37°C.

Los resultados obtenidos fueron:

Concentración de sustrato(mM)	1/S mM ⁻¹	Disminución viscosidad	Actividad U/ml	(1/V).10 ³ 1/U/ml.10 ³
0,51	1,96	2"	1,17	854,7
1,53	0,64	4"	2,28	438,5
2,55	0,39	6"	3,43	291,5
3,57	0,28	6"	3,35	298,5
4,59	0,22	8"	4,52	210,8
5,61	0,18	8"	4,44	221,2
6,63	0,15	10"	5,58	179,2
7,65	0,13	11"	6,07	164,7
8,67	0,11	12"	6,55	152,6
9,69	0,10	16"	8,74	114,4

Coeficiente de correlación 0,97

La recta de regresión es $y = 134,66 + 379,68x$.

$x = -0,35$ para $y=0$.

$K_m = 1/0,35 = 2,85$ mM

$V_{max} = 7,4$ U/ml.

Estos resultados se encuentran representados en la fig.25.

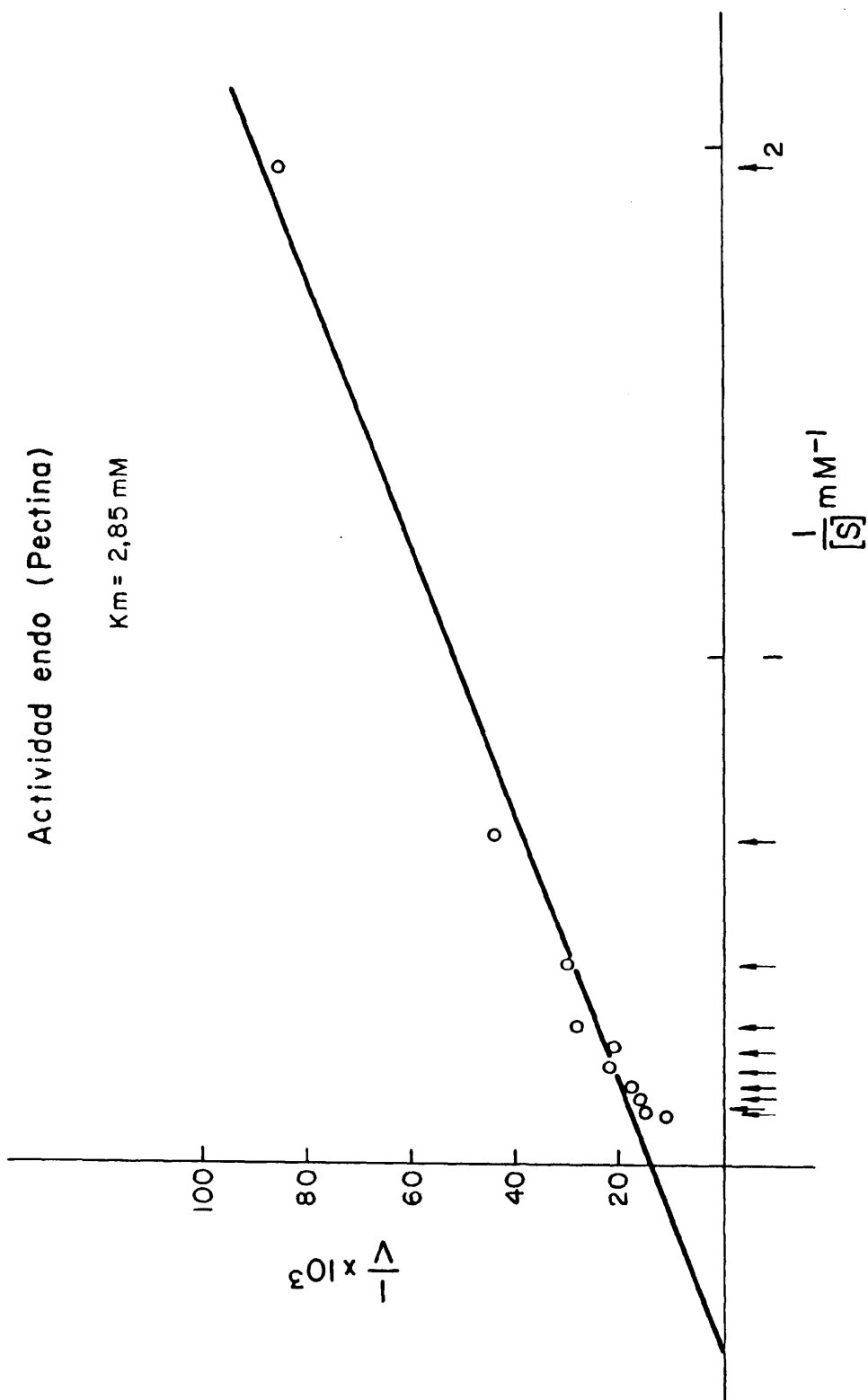


Fig. 25.- Velocidad máxima y constante de Michaelis.

III.20.- PROPIEDADES FISICAS DEL COMPLEJO ENZIMATICO DEL
HONGO Alternaria alternata.

Se ha estudiado el peso molecular de las enzimas pécticas integrantes del complejo enzimático de A.alternata, su punto isoeléctrico y su movilidad en geles de poliacrilamida.

III.20-1.- FILTRACION EN SEPHADEX G-200.

El complejo enzimático de A.alternata fue obtenido a los 27 días de incubación por precipitación con ácido tánico y sometido a una filtración en gel sephadex G-200.

En las fracciones recogidas fueron valoradas las actividades enzimáticas relativas a las sustancias pécticas, determinamos poligalacturonasa y polimetilgalacturonasa por la liberación de azúcares reductores, pectinliasa y pectatoliasa por el incremento en la absorción a 235nm. y las actividades endo sobre pectina y sobre poligalacturonato sódico valorando la disminución de la viscosidad.

En todas las fracciones determinamos proteínas por el método de Lowry (1951).

Representamos gráficamente los resultados de un experimento de los tres realizados en las fig.26,27 y 28.

Las medias de los tres experimentos nos llevó a estimar los pesos moleculares de las proteínas con actividad

péctica que integran este complejo (fig.29) en los siguientes valores:

PG	72500 ± 5000
PMG	33800 ± 5000
PAL	87000 ± 5000
PL	55000 ± 5000
Endo-pectinal	6200 ± 5000
Endo-ác.pol.	131000 ± 5000

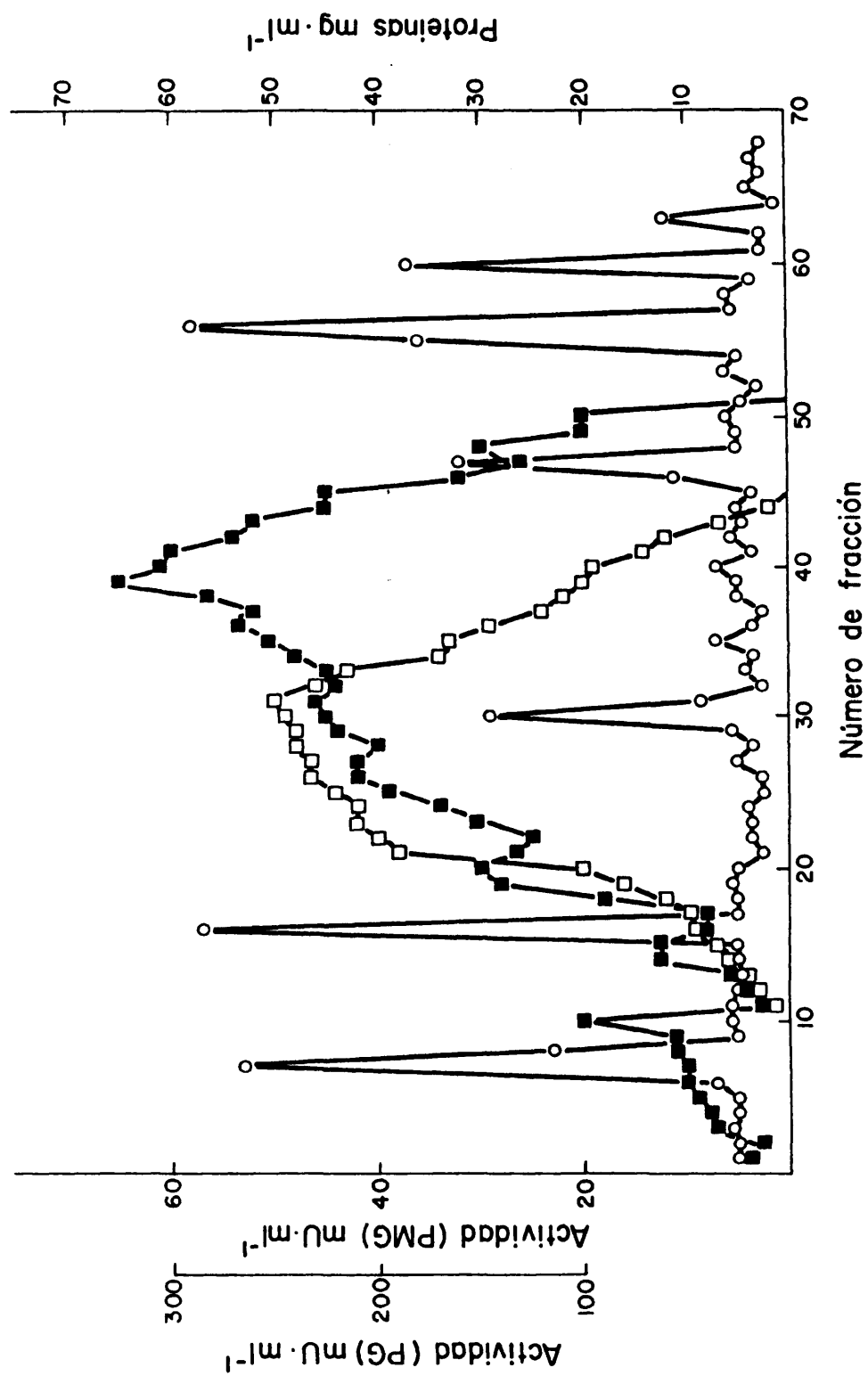


Fig. 26.- Filtración en Sephadex G-200. (□) Poligalacturonasa. (■) Polimetilgalacturonasa.
(o) Proteínas.

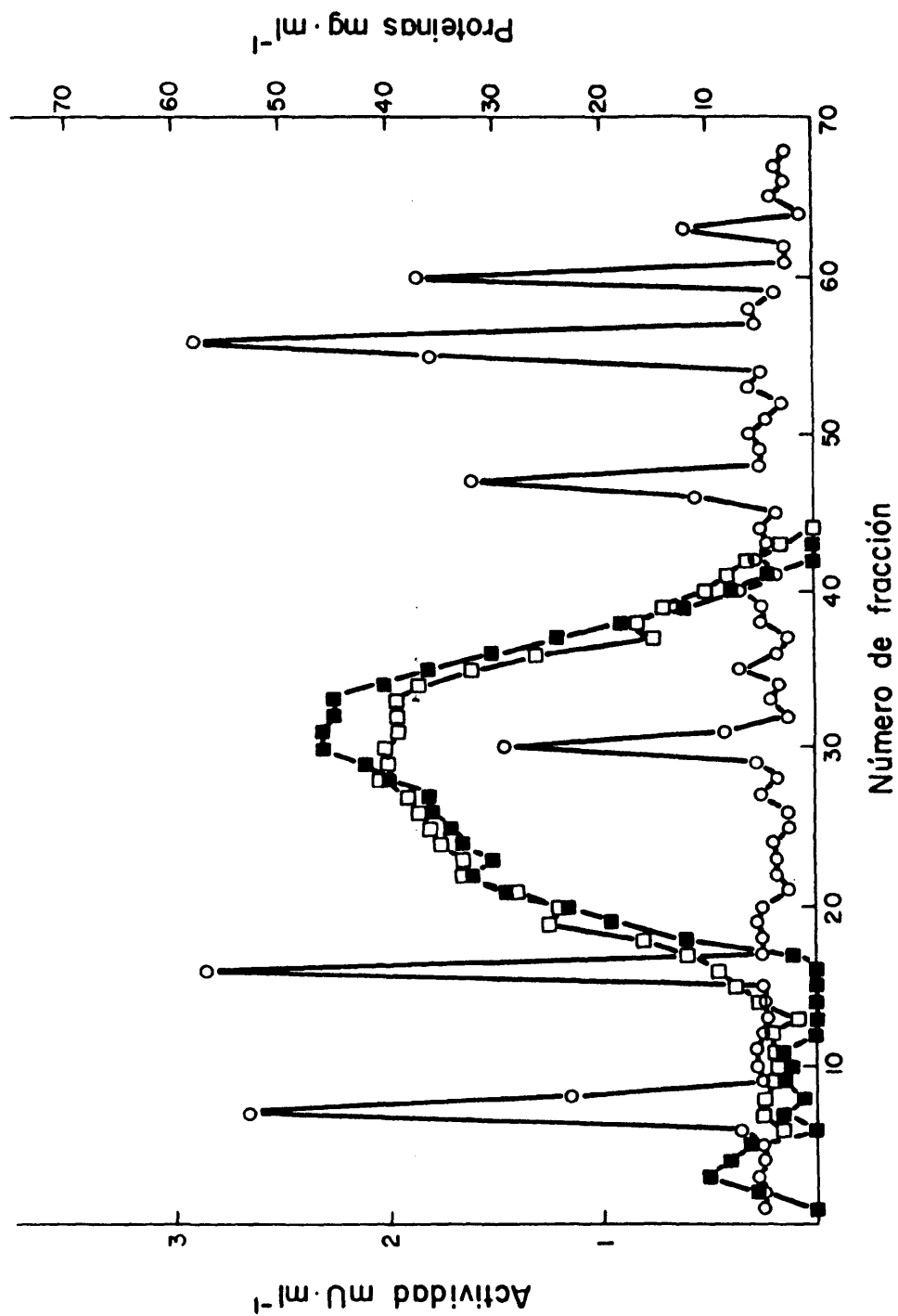


Fig. 27.- Filtración en Sephadex G-200. (□) Pectatoliase. (■) Pectinliase.
(○) Proteínas.

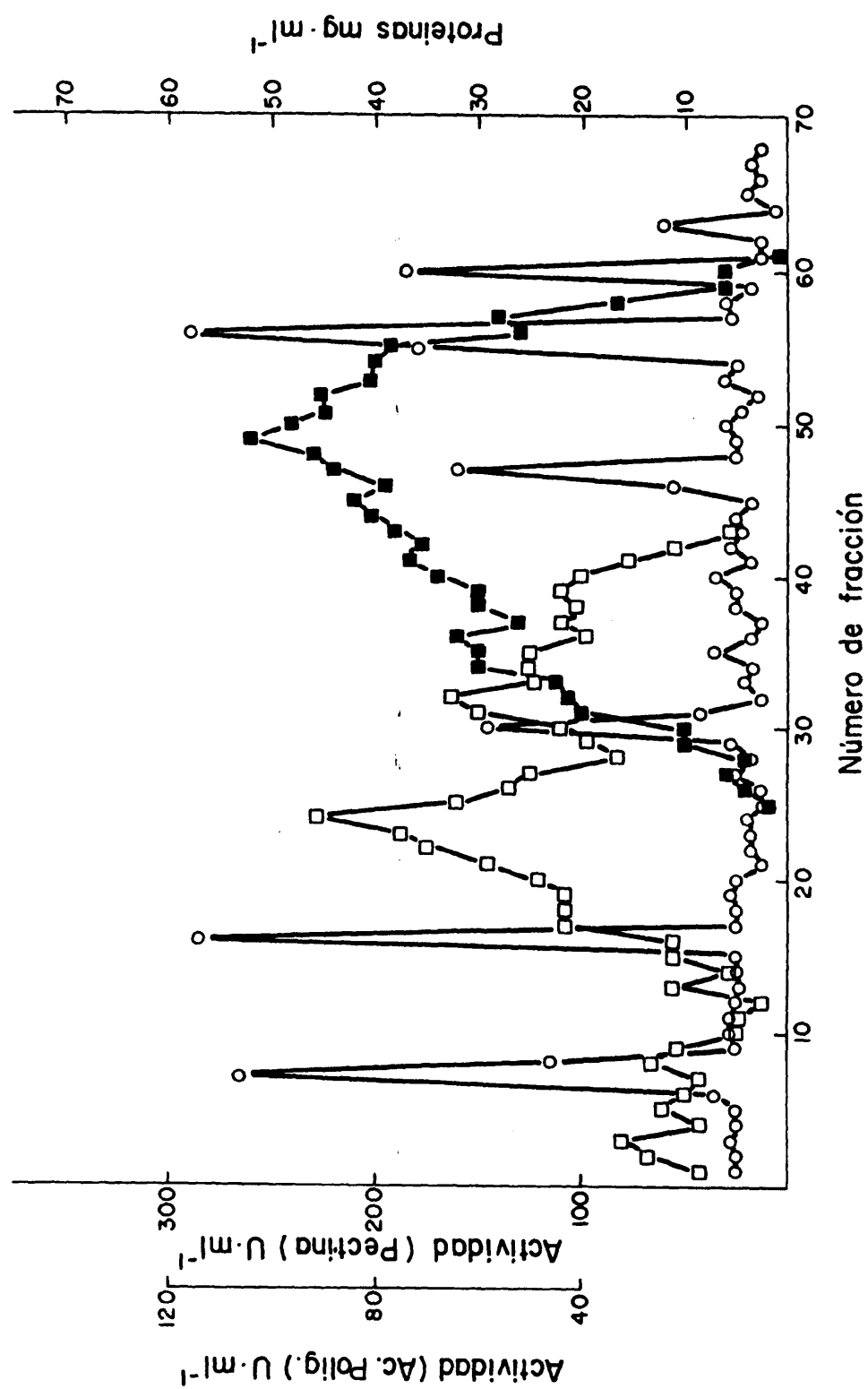


Fig. 28.- Filtración en Sephadex G-200. (■) actividad endo frente a pectina. (○) actividad endo frente al ác. poligacturónico. (□) Proteínas.

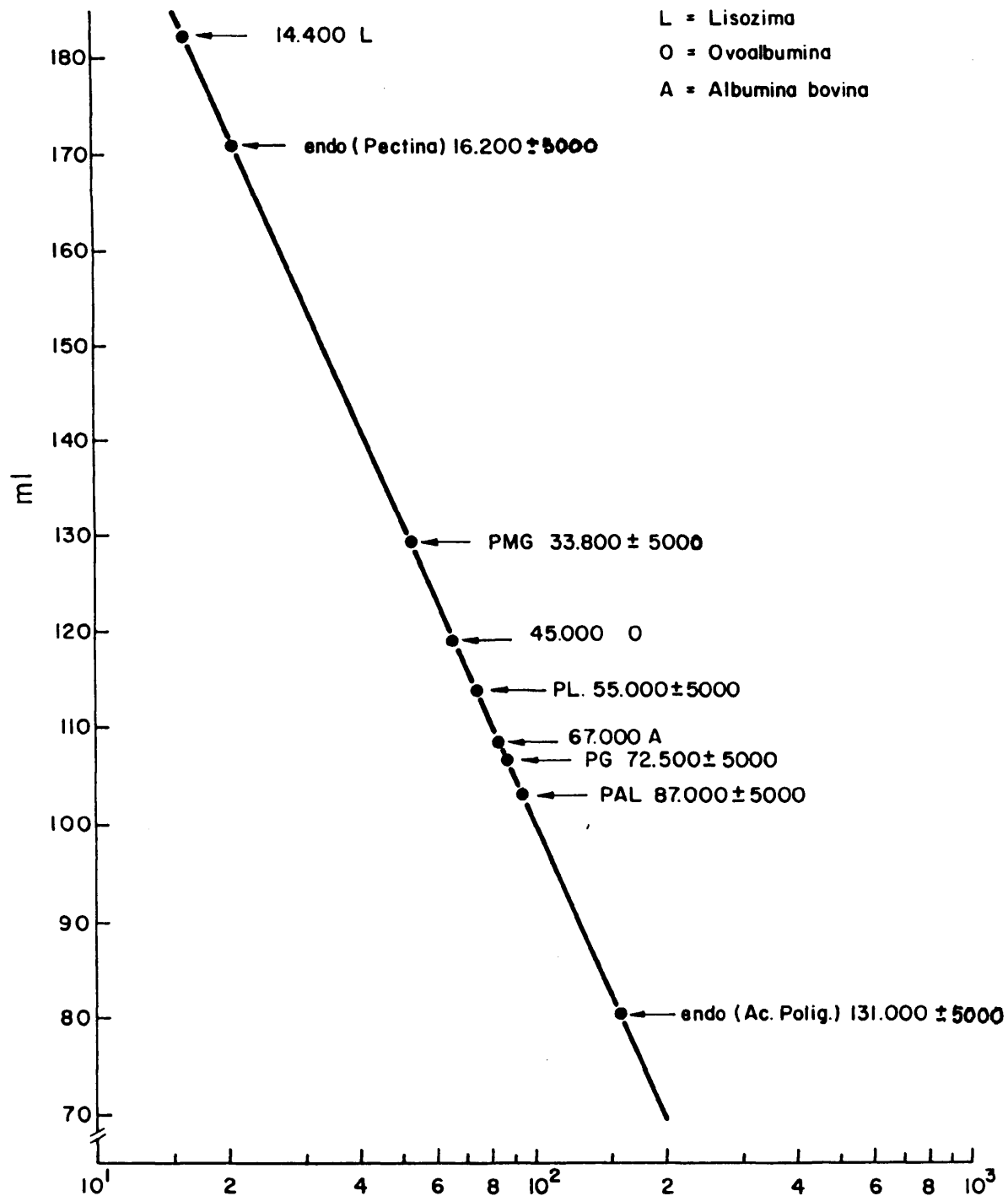


Fig. 29.- Pesos moleculares.

III.20-2.- DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO.

El complejo enzimático de A.alternata a los 27 días de incubación, obtenido por precipitación con ácido tánico, fue sometido a una columna de electroenfoque para separar las proteínas según sus puntos isoeléctricos.

Las muestras recogidas fueron dializadas durante 60 horas frente a agua destilada y en ellas determinamos los valores de pH y las actividades pécticas.

Los resultados se encuentran representados en las siguientes figuras.

Los puntos isoeléctricos obtenidos para las proteínas pécticas que integran el complejo enzimático de A.alternata son:

<u>Actividad</u>	<u>Punto isoeléctrico</u>	
PG	5,06	9,80
PMG	4,38	9,62
PAL	6,45	9,62
PL	5,79	9,62
Endo-ác.polig.		9.04
Endo-pectina	3,38	9,04

Para las enzimas PG, PMG, PAL, y PL la actividad mayor es la que corresponde a los PI comprendidos entre 5 y 7. Mientras que para las actividades endo la actividad más alta corresponde al PI de 9.

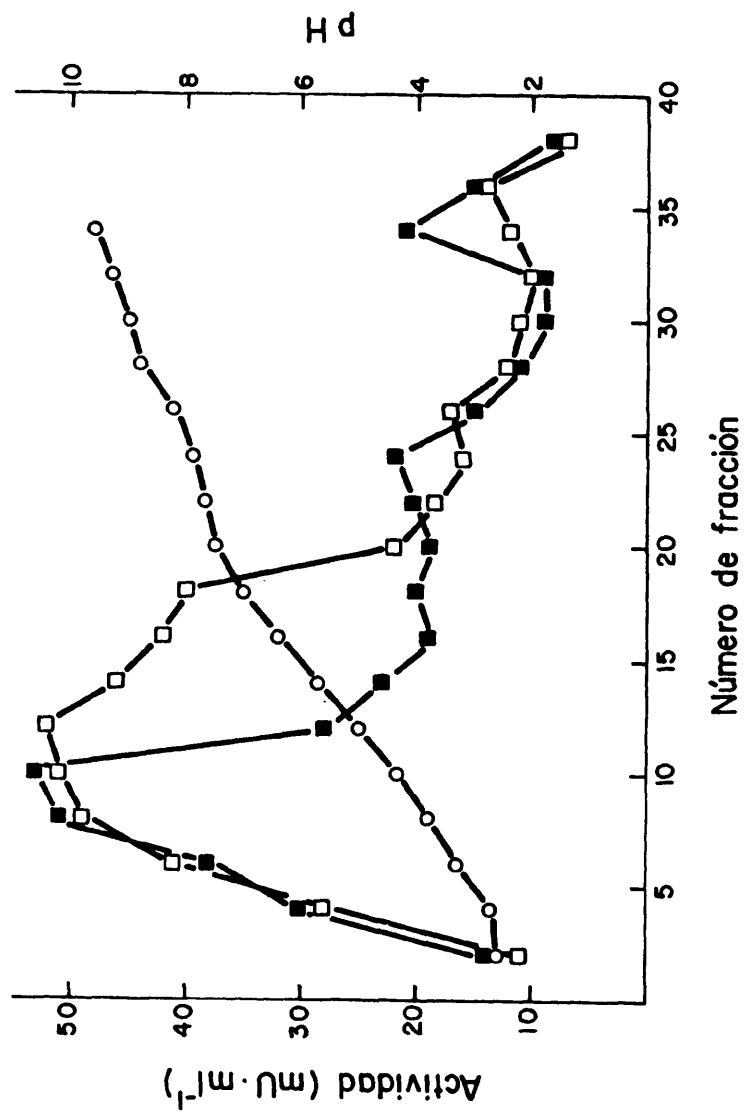


Fig. 30.- Puntos isoelectrónicos. (□) Poligalacturonasa. (■) Polimetilgalacturonasa. (○) pH.

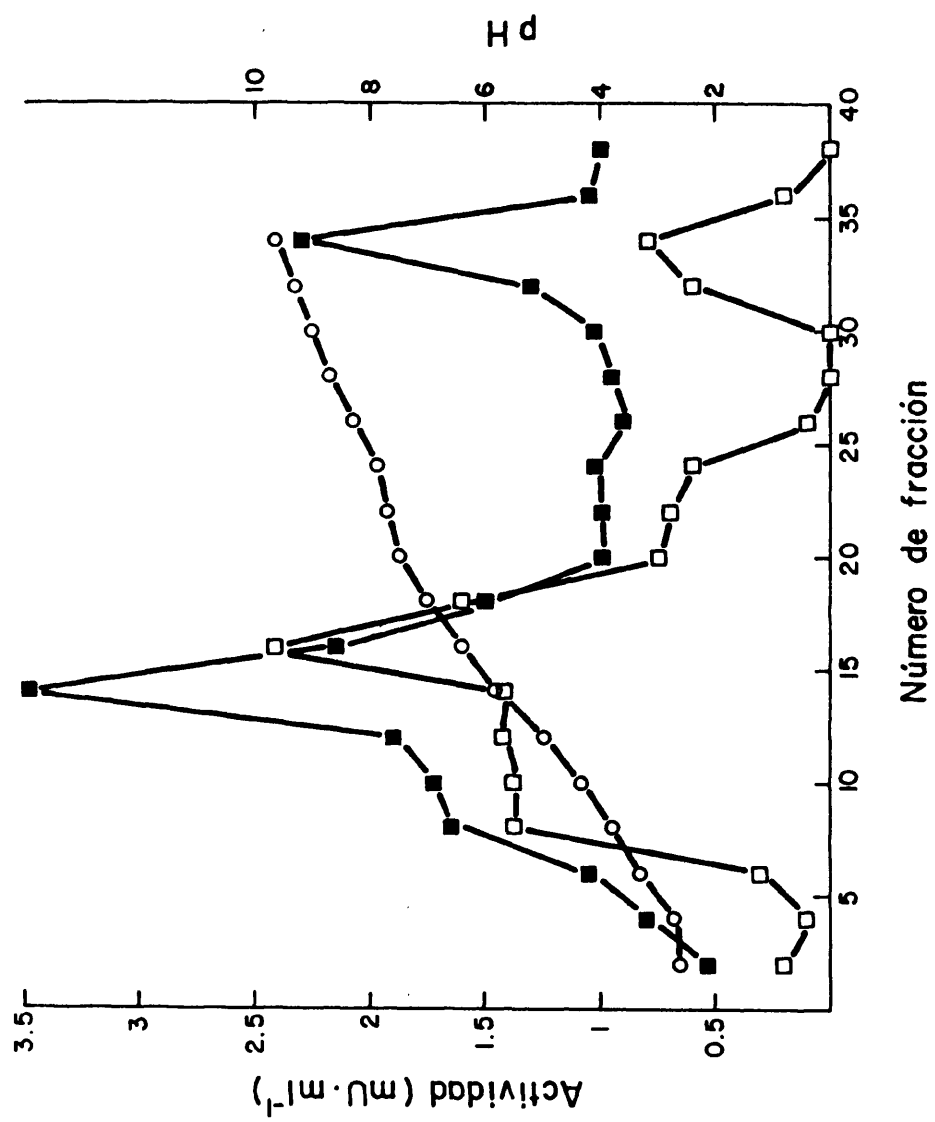


Fig.31.- Puntos isoelectrónicos.(□) Pectatoliasa.(■) Pectinliasa.(○) pH.

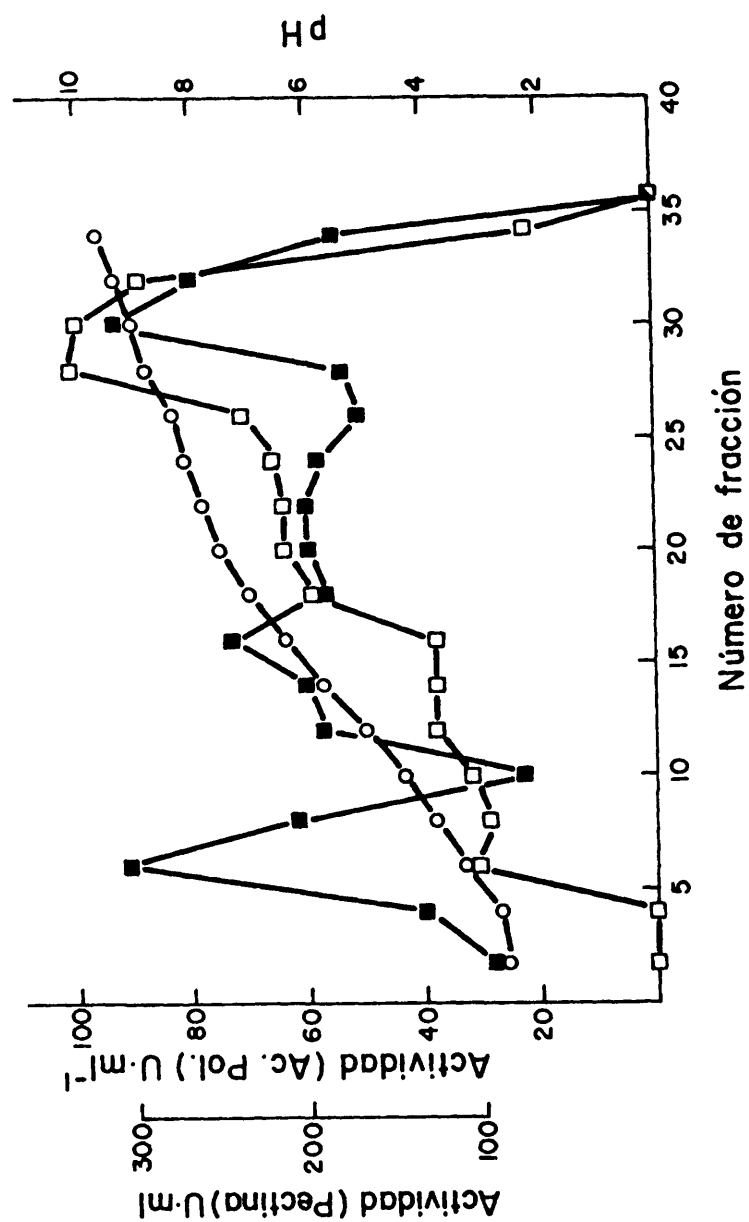


Fig. 32.- Puntos isoelectrónicos. (■) Actividad endo frente a pectina.
 (□) actividad endo frente al ácido poligalacturónico. (○) pH.

III.20-3.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

El complejo enzimático de A.alternata a los 27 días de incubación, precipitado con ácido tánico, fue sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida-pectina y teñidos después de un período de incubación, para detectar la presen
cia de actividades pécticas según el método descrito por Cruic
kshank (1980).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 7%. Pectina de manzana a una concentración de 1 mg/ml., fue disuelta en el gel por agitación antes de añadir el persulfato amónico, el aire se elimina mediante vacío durante un tiempo de 30 segun
dos a 1 minuto.

El tampón del gel de separación fue Tris-ClH de pH 8,9. La muestras de proteínas se disuelven en tampón Tris-ClH de pH 6,7 y se aplican de 50 a 100 µg. por gel para ver la ac
tividad enzimática, para ver proteínas totales se aplican 300 µg. por gel.

La electroforesis se lleva a cabo a 2°C cuando se trata de ver las actividades. La intensidad de la corriente es constante, durante los primeros 20 minutos se hace pasar 1 mA. por gel y después 2 mA. por gel.

La duración media de la electroforesis para estos extractos enzimáticos es de 4 horas aproximadamente.

Incubación:

Cada gel es incubado a 37°C en ácido málico 0,1 M, el cual produce en el gel un cambio gradual de pH en 90 minutos.

Para demostrar la presencia de actividad liasa los geles se incubaron en ácido málico añadiendo cloruro cálcico 0,002 M. El tiempo óptimo de incubación fue entre 30 y 60 minutos, observándose peores resultados con tiempos mayores.

Tinción para actividades pécticas:

Después del período de incubación, los geles se lavan varias veces con agua destilada y se ponen en rojo de ru_{tenio} al 0,02 % durante un máximo de 2 horas, la decoloración se realiza en un baño con agua destilada durante 24 horas.

La actividad poligalacturonasa se pone de manifiesto por la presencia de zonas no teñidas, ya que el rojo de ru_{tenio} se une a la pectina en aquellas zonas que no ha sido di_{gerida}.

La actividad liasa se observa comparando los geles que han sido incubados en presencia de cloruro cálcico con aquellos que solamente se han incubado en ácido málico, puesto que esta actividad es inhibida en presencia de iones Ca.

Tinción no específica para proteínas:

Después de realizada la electroforesis los geles se tiñeron con Coomasie R-250 en solución al 0,025% durante un tiempo de 10 horas.

La decoloración se realiza en un baño agitado con una solución de metanol, ácido acético y agua (6/2/14, v/v/v) esta solución se cambia varias veces durante 48 horas.

En las fig.33 y 34 comparamos la separación de las proteínas del complejo enzimático de A.alternata en un gel de poliacrilamida al 7% con otro que lleva pectina a una concentración de 1 mg/ml., con el fin de observar si la pectina introduce alguna modificación fundamental en cuanto a la movilidad de las proteínas, observando que la pectina produce una ligera disminución en la resolución de las proteínas.

El proteinograma nos revela una banda mayoritaria en el comienzo, y otras pequeñas bandas a lo largo del gel.

Cuando los geles han sido revelados con rojo de rutenio para poner de manifiesto la actividad enzimática, se observa a los 15 minutos de incubación, siendo el tiempo óptimo en estas condiciones de 30 minutos, tiempos mayores de incubación nos dan peores resultados llegando incluso a la decoloración total del gel.

Parte de la actividad que observamos en los geles de poliacrilamida-pectina es inhibida cuando los geles son incubados en presencia de Ca, esta actividad corresponde a una liasa (Albersheim 1961).

Fig. 33.- DENSITOMETRIA Y FOTOGRAFIA DEL COMPLEJO ENZIMATIC
CO DE *Alternaria alternata* EN GEL DE POLIACRILAM
MIDA AL 7%.

nm

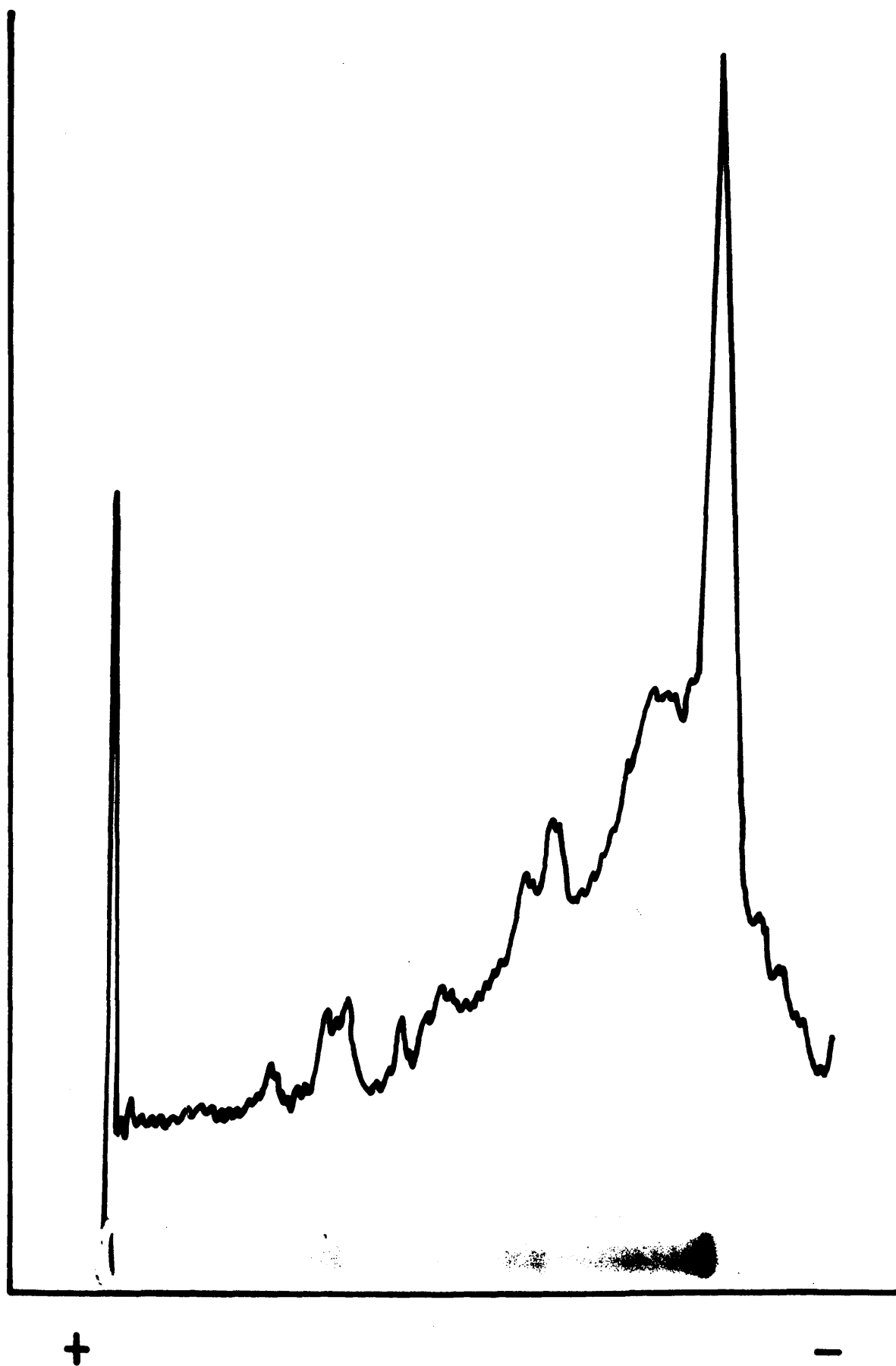


Fig. 34.- DENSITOMETRIA Y FOTOGRAFIA DEL COMPLEJO ENZIMATII
CO DE *Alternaria alternata* EN GEL DE POLIACRILAMII
DA AL 7% CON PECTINA.

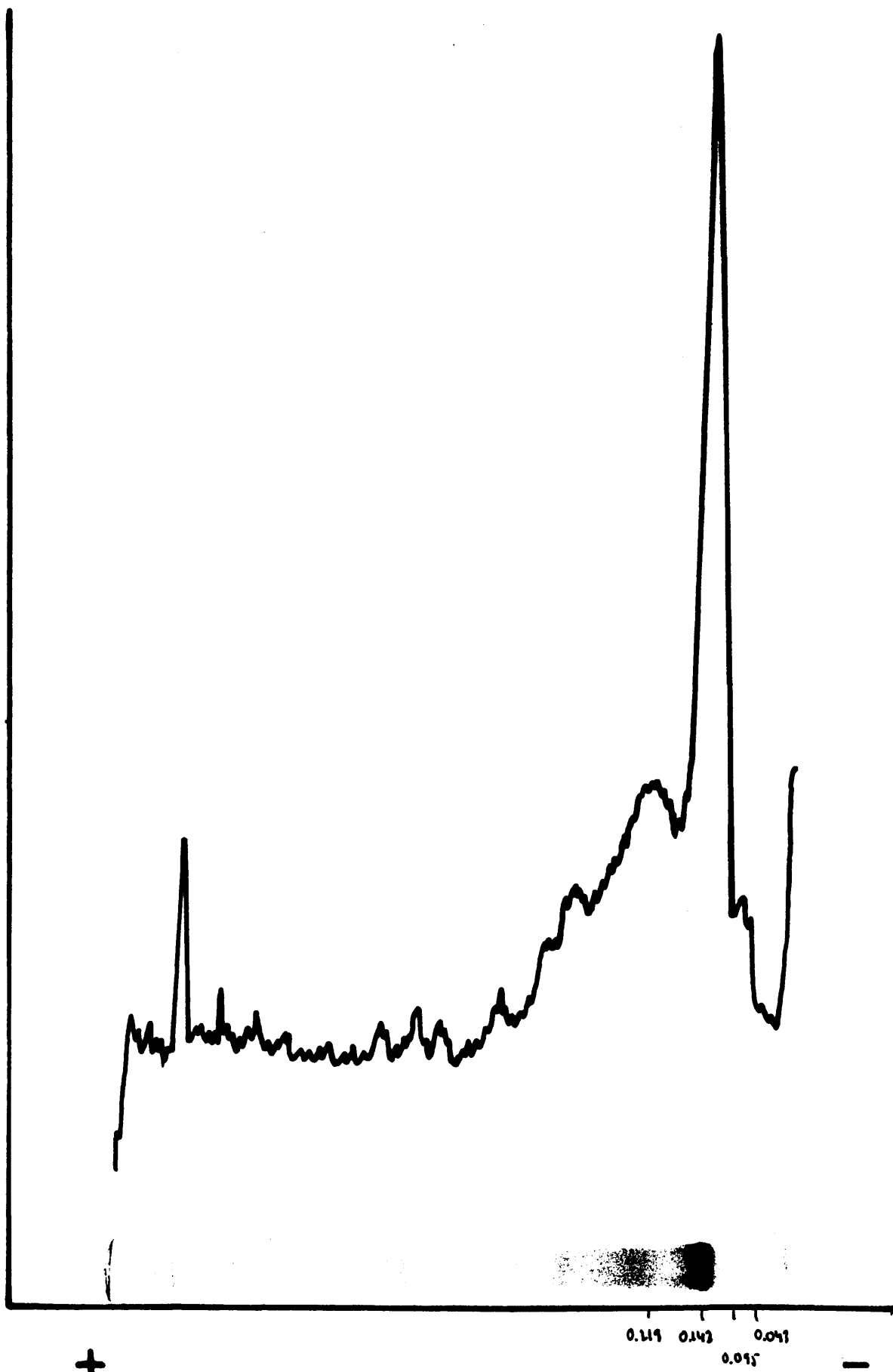
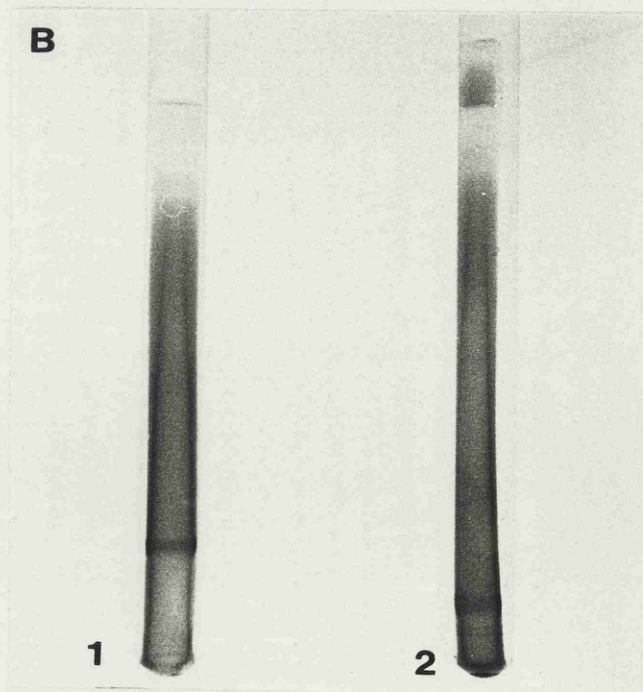
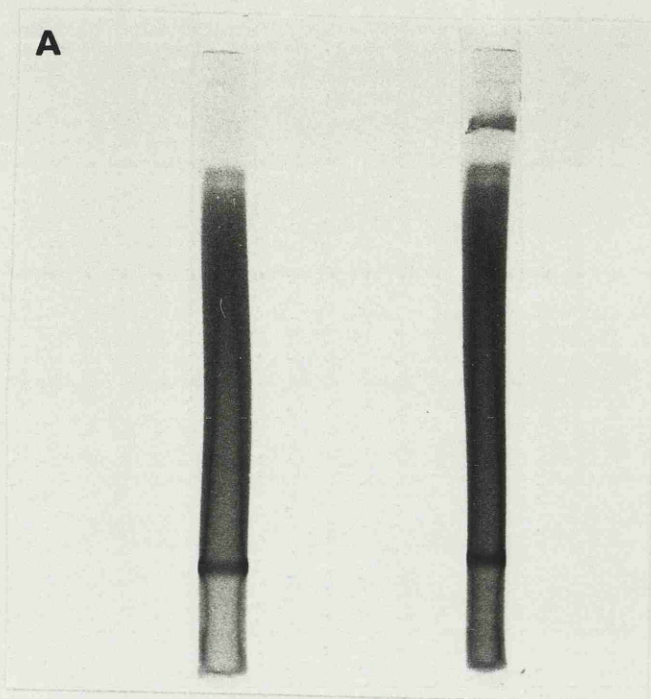


Fig. 35.- ZYMOGRAMA DEL COMPLEJO ENZIMATICO DE *Alternaria alternata*, incubando el gel en ácido málico (1), incubando el gel en ácido málico y cloruro cálcico (2).

A- 30 minutos de incubación.

B- 60 minutos de incubación.



III.21.- PRODUCTOS DE REACCION DEL COMPLEJO ENZIMATICO SOBRE
LOS SUSTRATOS.

Los productos de la reacción enzimática sobre los dos sustratos fueron analizados sometiéndolos a filtración en una columna de Bio-Gel P₂, con objeto de separar los monómeros, dímeros y trímeros etc.

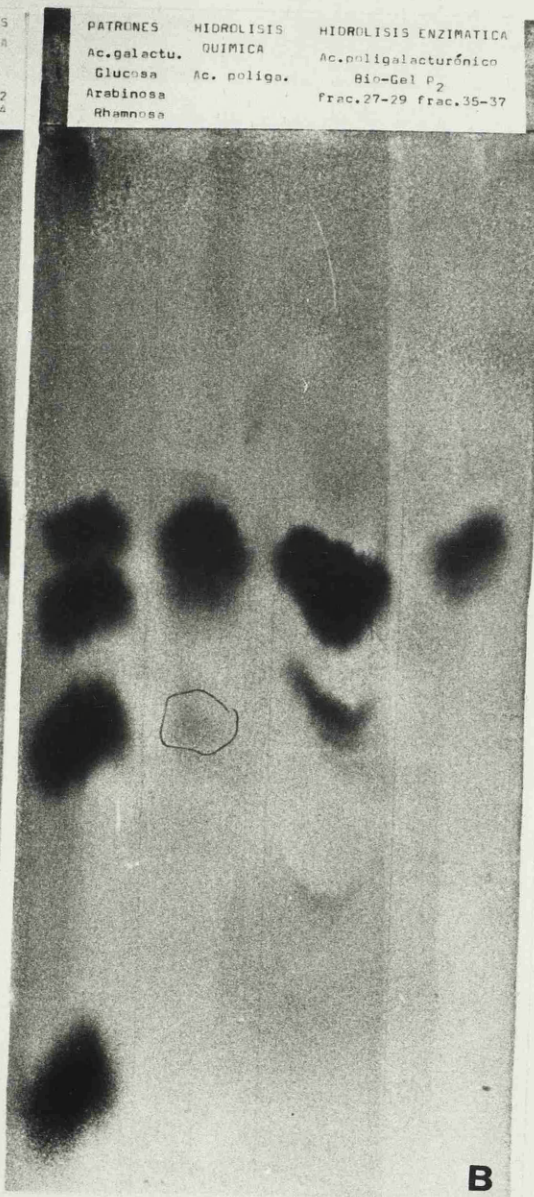
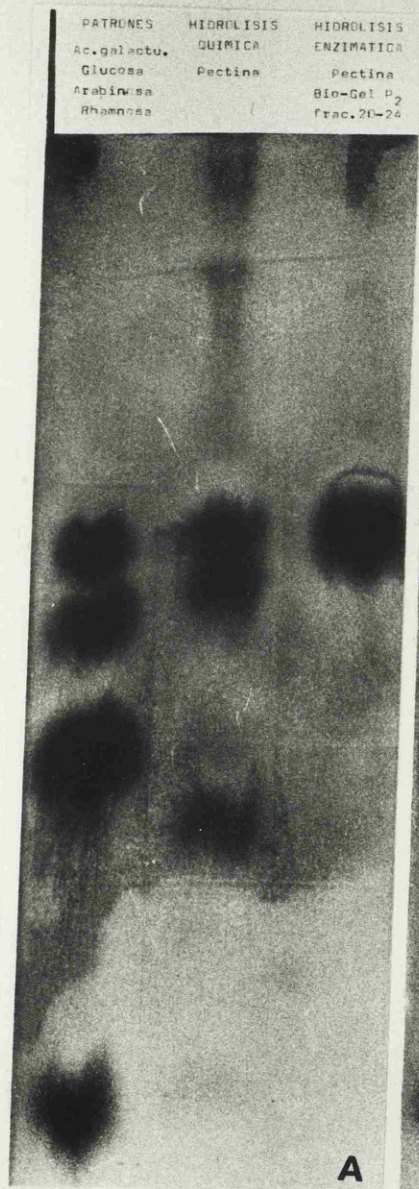
Sobre la pectina y como azúcares reductores se detecta un único pico de actividad entre las fracciones 20-24, esta actividad en cromatografía de papel corresponde al ácido galacturónico.

En la hidrólisis enzimática del poligalacturonato sódico detectamos tres máximos de actividad que corresponden a las fracciones siguientes:

- 19-21, actividad que no es detectada en cromatografía de papel.
- 27-29 corresponderían al ácido galacturónico y a la arabinosa.
- 35-37 al ácido galacturónico.

El tiempo de incubación fue de tres horas a 37°C para ambos sustratos. Estos resultados están representados en la fig. 36.

Fig. 36.- PRODUCTOS DE LA REACCION DEL COMPLEJO
ENZIMATICO DE *Alternaria alternata*.
A- sobre pectina.
B- sobre ácido poligalacturónico.



III.22. - MACERACION DE TEJIDOS.

La maceración de tejidos se realizó en zanahoria, patata y tomate. Los experimentos fueron realizados en tres medios:

- a) solución tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5.
- b) solución tampón de McIlvaine 0,1 M y pH 5,5.
- c) agua destilada.

Las condiciones óptimas de incubación, después de realizar varios ensayos fueron de 160 rpm. y de 40°C, una agitación más lenta influía negativamente en el volumen de células liberadas de los tejidos.

El tiempo de incubación influía directamente sobre las sustancias reductoras, el ácido galacturónico y el volumen de células liberadas. Para nuestros experimentos hemos elegido un tiempo de incubación de 5 horas.

La presencia de 1 mg. de albúmina bovina por matraz produce una pequeña estimulación en la actividad enzimática reflejada por un incremento en las sustancias reductoras y en el ácido galacturónico.

El pH de las soluciones tampón fue de 5,5, por ser este el pH óptimo de algunas actividades enzimáticas del complejo de Alternaria alternata.

En las siguientes figuras comparamos el volumen de células sedimentadas en solución tampón de McIlvaine con las sedimentadas en agua, por ser en este tampón donde el número de células liberadas era mayor.

Ninguna célula de tejido de patata y zanahoria se separa en los controles, sin presencia de enzimas.

En tomate, tanto en el blanco del tampón como en el blanco del agua, se produce liberación de células, que podría explicarse por la consistencia del tejido.

Los resultados obtenidos respecto a las sustancias reductoras, ácido galacturónico y conductividad están representados en las tablas siguientes:

PATATA

	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml.}$ -----	CONDUCTIVIDAD mho/cm. -----	ACIDO GALACTURONICO $\mu\text{mol/ml.}$ -----
c-f-b enzima patata	4,71	4028,9	2,44
blanco	0,75	4005,4	0,84
McIlvaine enzima patata	8,42	9784,7	1,15
blanco	0,67	9784,7	0,33
agua enzima patata	5,71	1876,4	3,03
blanco	0,82	1280,2	0,73

TOMATE

	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml.}$ -----	CONDUCTIVIDAD mho/cm. -----	ACIDO GALACTURONICO $\mu\text{mol/ml.}$ -----
c-f-b enzima tomate	17,85	3458,0	7,83
blanco	10,50	3185,5	5,79
McIlvaine enzima tomate	15,28	8470,0	2,14
blanco	11,18	8350,7	1,65
agua enzima tomate	16,97	992,6	7,22
blanco	15,42	913,2	6,07

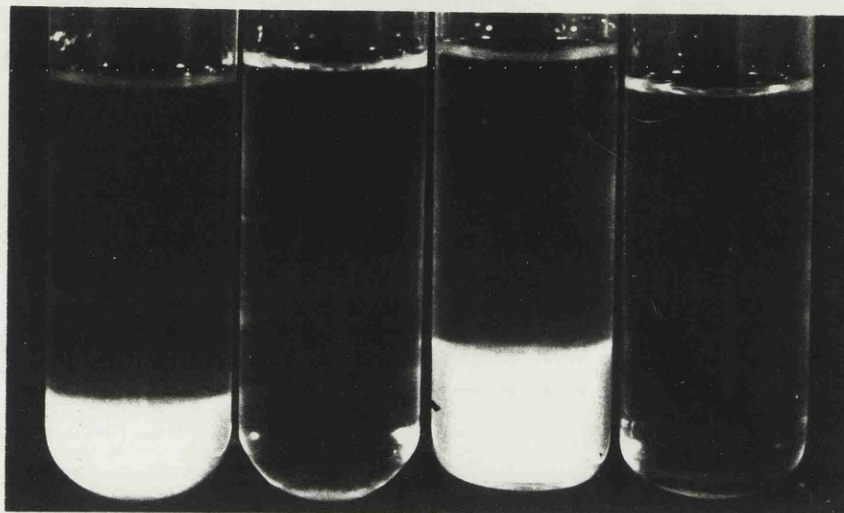
ZANAHORIA

	SUSTANCIAS REDUCTORAS $\mu\text{mol/ml.}$ -----	CONDUCTIVIDAD mho/cm. -----	ACIDO GALACTURONICO $\mu\text{mol/ml.}$ -----
c-f-b			
enzima zanahoria	16,78	3043,9	7,78
blanco	15,57	2914,4	7,34
McIlvaine			
enzima zanahoria	14,64	9144,6	6,94
blanco	15,42	9784,7	5,08
agua			
enzima zanahoria	20,74	4999,9	7,83
blanco	4,57	2127,1	7,22

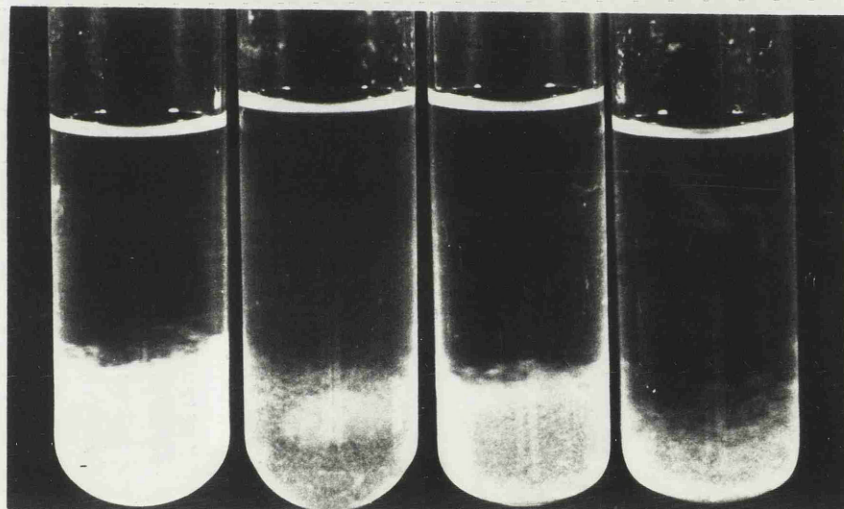
Fig.37.- CELULAS LIBERADAS EN TEJIDO DE PATATA(A), TOMATE(B)
Y ZANAHORIA(C).

- 1- Células sedimentadas en tampón de McIlvaine con
solución de enzimas.
- 2- Control en tampón de McIlvaine.
- 3- Células sedimentadas en agua con solución de enz
imas.
- 4- Control en agua.

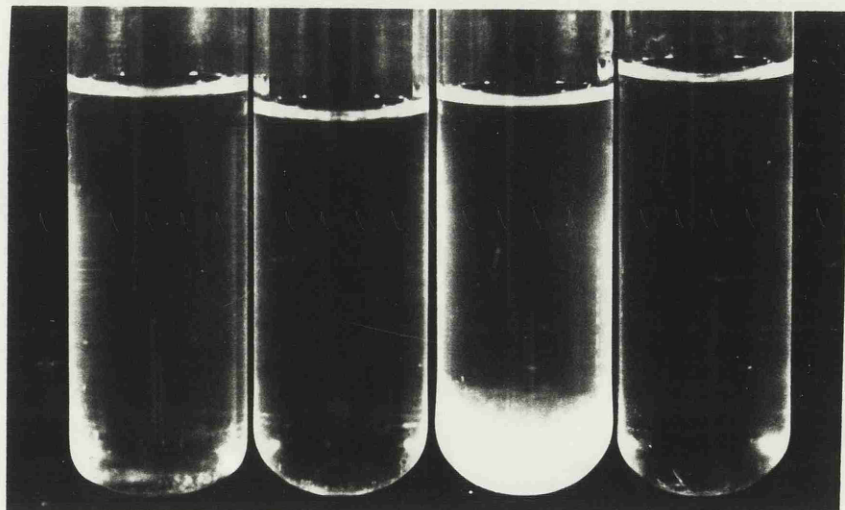
A



B



C



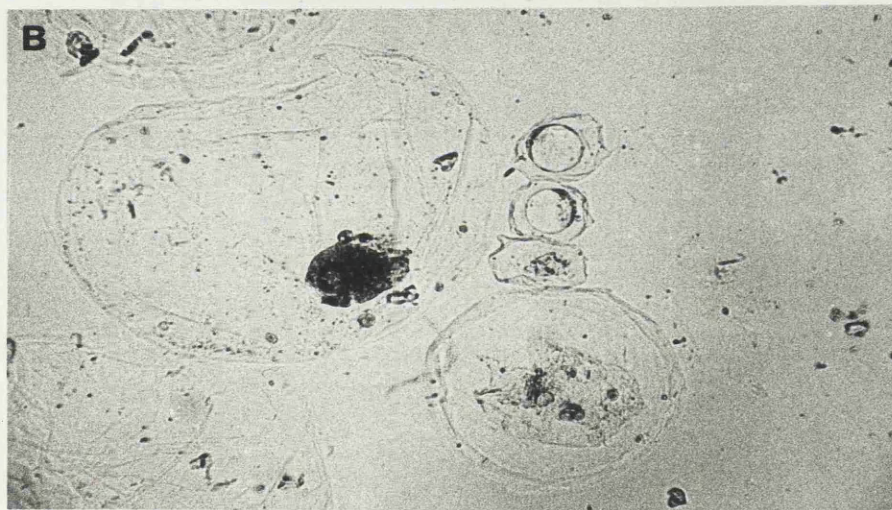
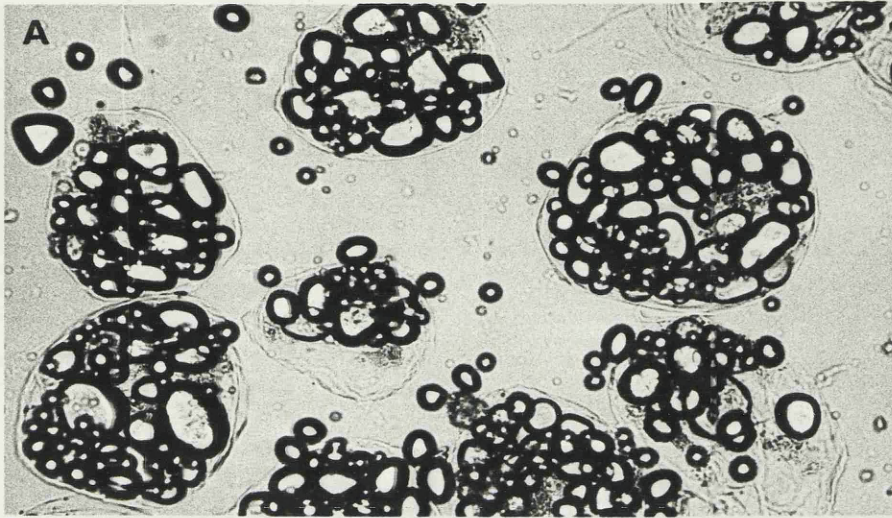
1

2

3

4

Fig. 38.- EXAMEN AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES
DE CELULAS LIBERADAS DE TEJIDO DE PATATA(A),
TOMATE (B) Y ZANAHORIA (C).



III.23 .- OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

El complejo enzimático de Alternaria alternata es capaz de liberar células y digerir la pared celular obteniendo protoplastos de tejidos vegetales, patata, tomate y zanahoria, cuando las condiciones son adecuadas.

Los estabilizadores osmóticos más apropiados en nuestro caso han sido manitol y sorbitol 0,4 y 0,8 M.

La cantidad de enzimas necesarios para la obtención de protoplastos varía según el tejido utilizado como fuente de protoplastos, así concentraciones de 0,8 mg/ml de complejo enzimático de A.alternata son suficientes para obtener protoplastos de tomate, mientras que se necesitaron concentraciones de 1 mg/ml. para la zanahoria y la patata.

El tiempo de incubación varía igualmente con la naturaleza del tejido, siendo suficiente un tiempo de 3 horas para el tomate, y tiempos de 5 horas para la zanahoria y la patata.

Las figuras siguientes ponen de manifiesto los resultados obtenidos.

Fig. 39.- FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES DE
PROTOPLASTOS DE PATATA. El tejido ha sido tratado
con el complejo enzimático de A.alternata.

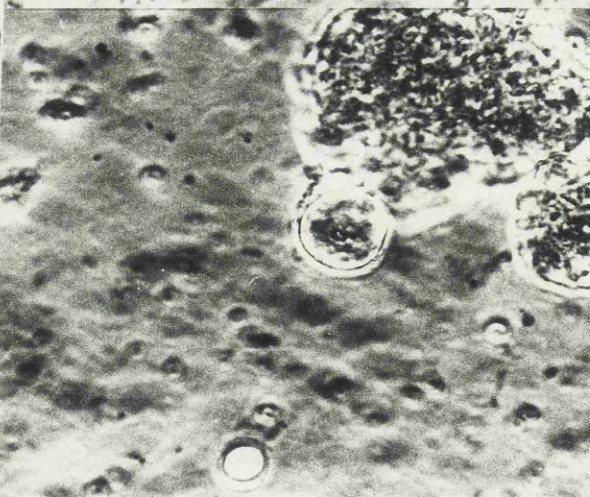
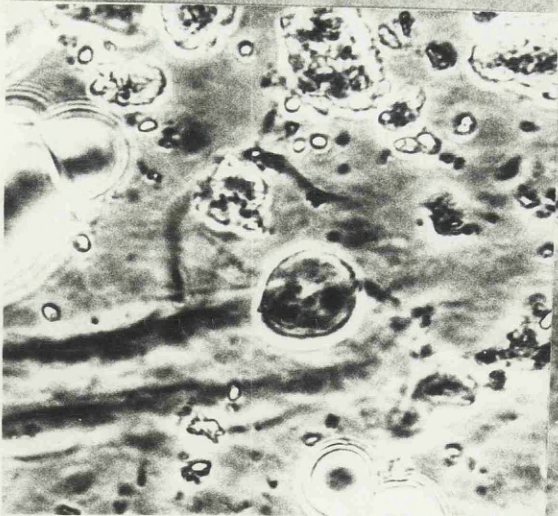
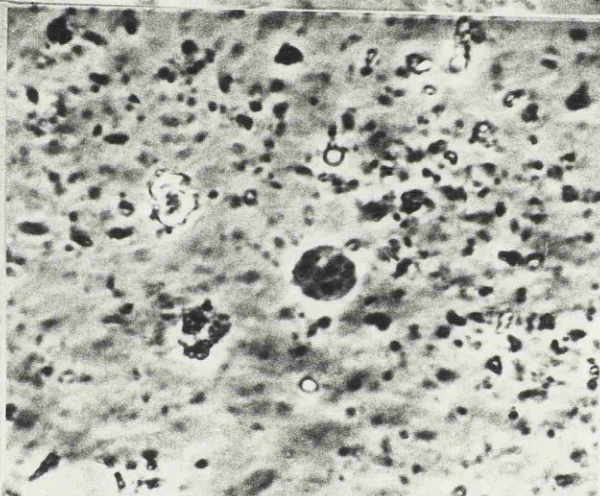
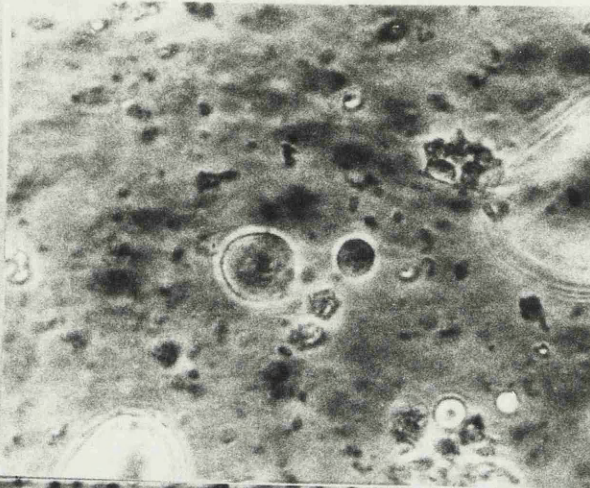
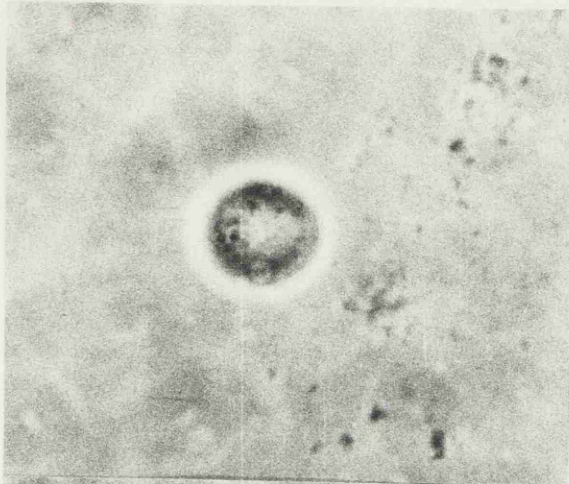


Fig. 40.- FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES DE
PROTOPLASTOS DE ZANAHORIA. El tejido ha sido trata-
do con el complejo enzimático de A.alternata.

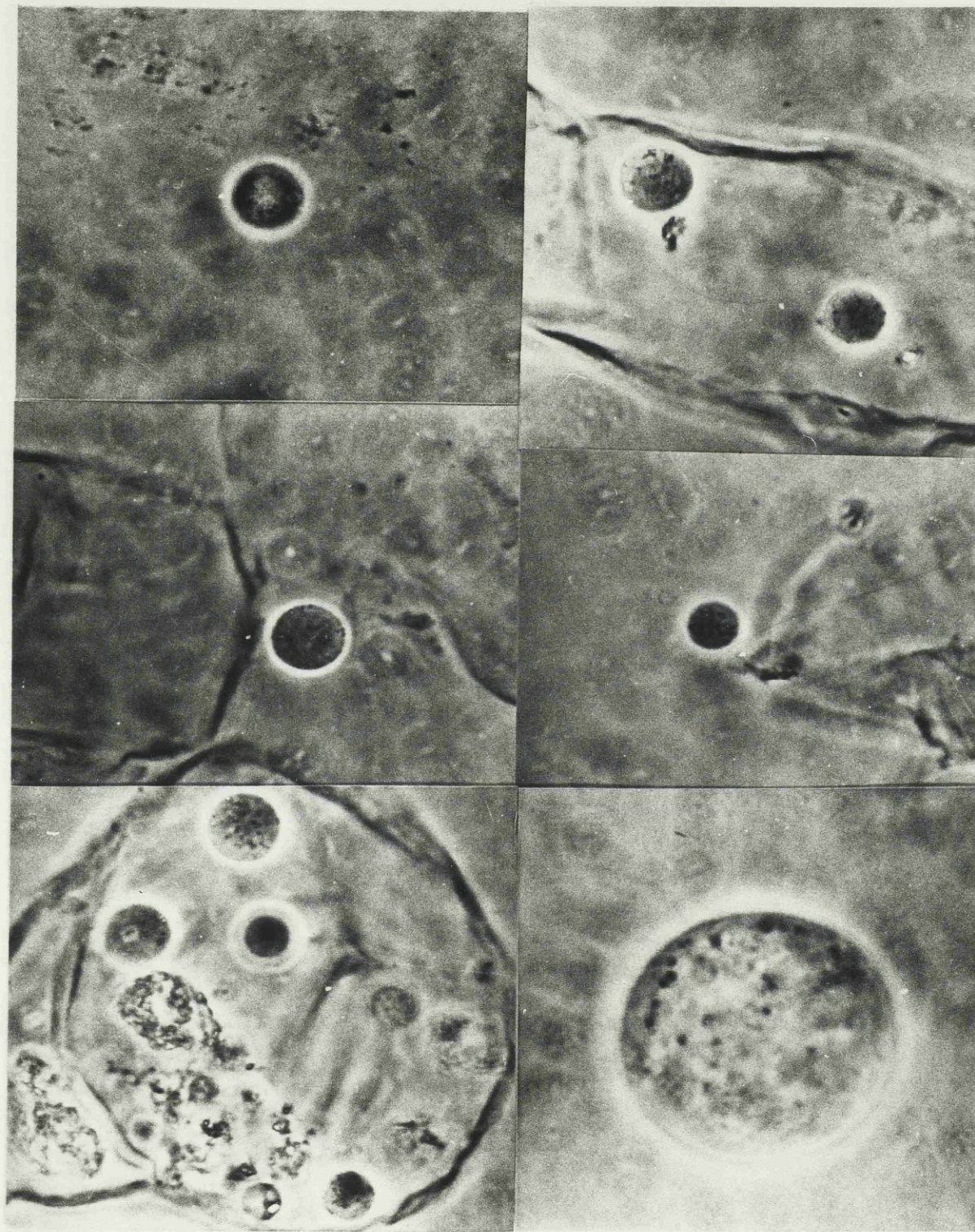


Fig. 41.- FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES
DE PROTOPLASTOS DE TOMATE. El tejido ha sido tra
tado con el complejo enzimático de A.alternata.

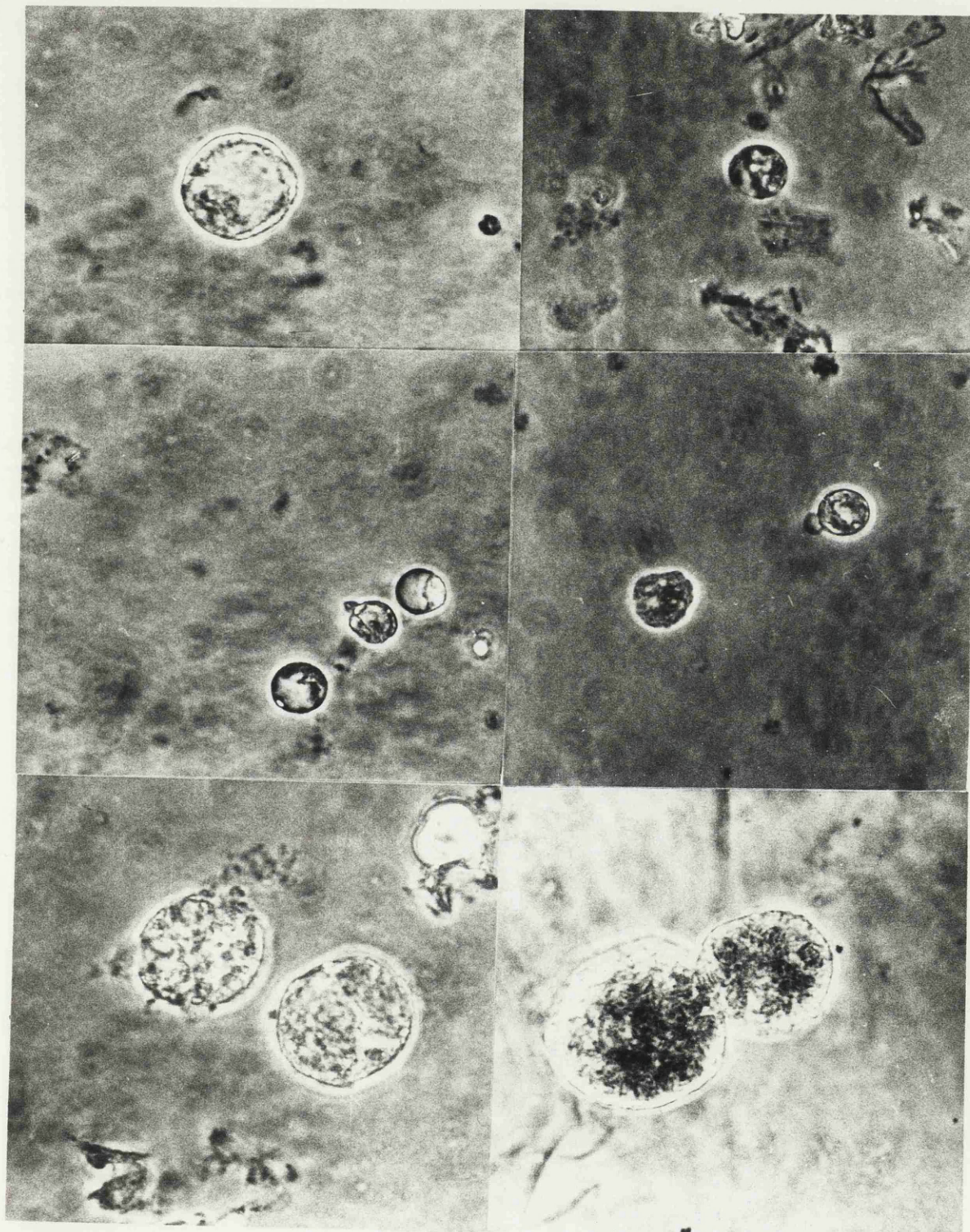
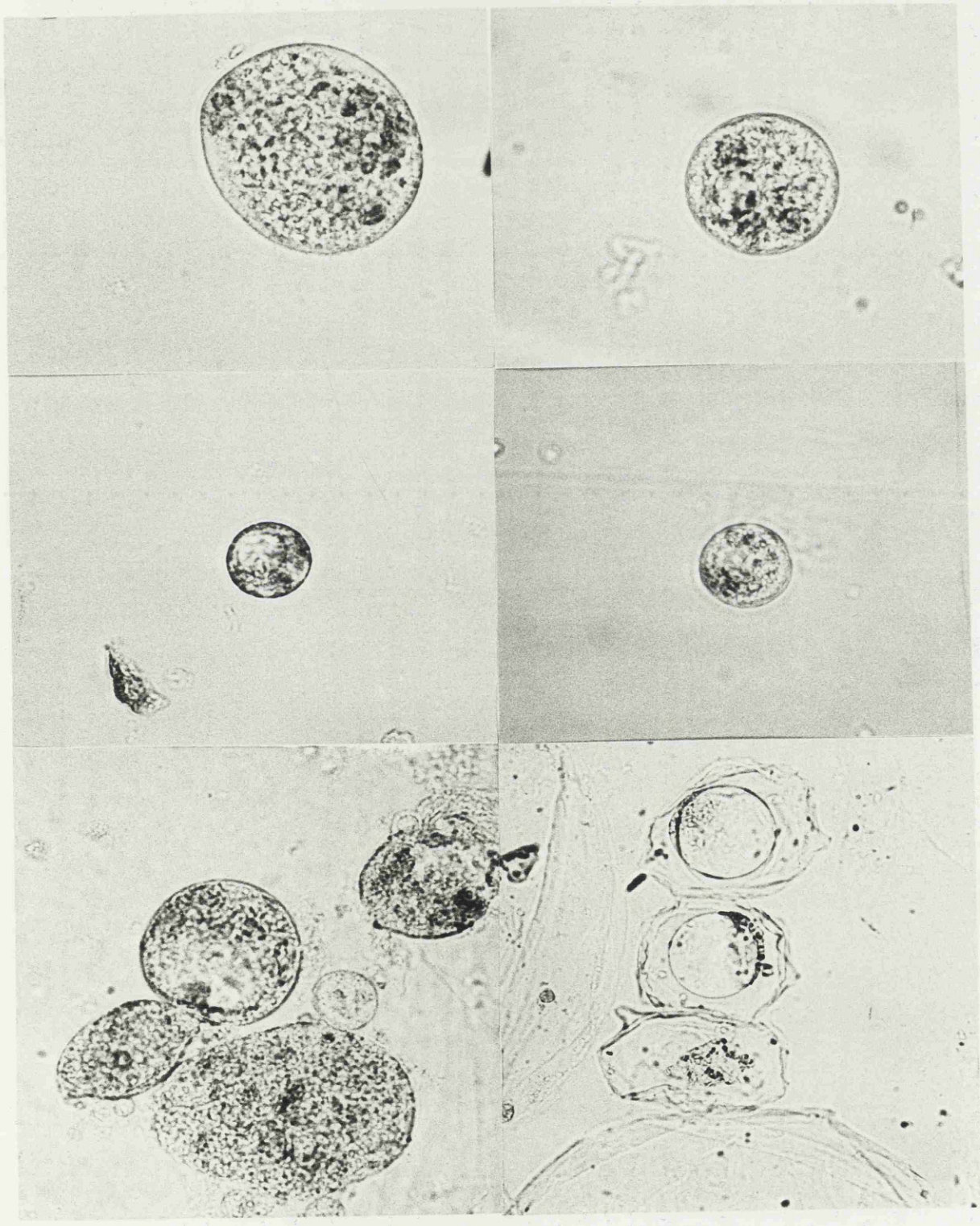


Fig. 42.- FOTOGRAFIA AL MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES DE
PROTOPLASTOS DE TOMATE. El tejido ha sido tratado
con el complejo enzimático de A.alternata.



IV.- DISCUSSION

Los hongos pueden producir enzimas que degradan polisacáridos tanto inductivamente como constitutivamente (Mullen y Bateman, 1975). La síntesis de una polisacaridasa es generalmente inducida por un monómero o dímero del polisacárido que usa como sustrato; así el ácido galacturónico y sus derivados estructurales inducen la síntesis de ciertas enzimas pécticas (Phaff, 1947 ; Keen y Horton, 1966), la celobiosa induce la síntesis de celulasas (Mandels y Reese, 1960) y la galactosa induce la síntesis de α -galactosidasas (English y col., 1971). Pero la síntesis de polisacaridasas es generalmente controlada por represión catabólica, si la velocidad del catabolismo excede a la del anabolismo, los catabolitos que se acumulan intracelularmente reprimen la síntesis de enzimas. Esto puede ser aplicado para enzimas inductivas y constitutivas (Hulme y Stranks, 1971; Paigen y Willians, 1970).

El criterio de inductividad viene dado generalmente por la detección de una mayor actividad enzimática cuando el microorganismo crece en un medio que contiene un polisacárido sustrato comparada con la actividad del microorganismo en un medio con glucosa (Keen y Erwin, 1971).

Las enzimas constitutivas pueden aparecer con mayor rendimiento al crecer el microorganismo sobre polisacáridos sustratos de la enzima, siempre que la velocidad de degradación de estos polisacáridos no cause represión catabólica, ya que las concentraciones de mono u oligosacáridos requeridas para la inducción de la síntesis, son generalmente muy peque

ñas.

Los polisacáridos insolubles de la pared celular normalmente no inducen la síntesis de enzimas (Reese, 1975) pero ellos pueden, probablemente, producir inductores después de ser degradados en pequeña proporción por niveles bajos de enzimas basales, hecho que pudo comprobar Bull (1972) para la inducción de 1,3- β -glucanasa de Streptomyces.

En este proceso las exoenzimas pueden ser más efectivas que las endoenzimas. Algunas de las llamadas endopectinasas, analizadas por su habilidad para reducir rápidamente la viscosidad del sustrato, actúan de las dos maneras, rompiendo las cadenas sin orden y dejando progresivamente residuos de bajo peso molecular como ocurre con las poligalacturonasas de Colletotrichum lindemuthianum (English y col., 1972) de Botrytis cinerea (Urbanenk y col., 1975) y Sclerotia rolf-sii (Bateman, 1972).

Durante el proceso ~~de~~ degradativo o autólisis de hongos filamentosos, hay un reciclaje de sustancias, de manera, que los metabolitos producidos por autólisis sirven para el crecimiento de nuevas hifas, pudiendo ver al microscopio en un cultivo autolizado hifas nuevas entre otras completamente autolizadas. Esto hace que el nivel de monosacáridos y oligosacáridos procedentes tanto de la degradación de las paredes celulares como de los carbohidratos de reserva sea muy bajo y constante en el líquido de cultivo, induciendo así la síntesis de enzimas líticas implicadas en la degradación del

hongo (Cooper y Wood, 1975); pudiendo en cierto modo considerar la autólisis como un proceso regulador autocatalítico de la síntesis de enzimas líticas.

Los estudios aquí descritos se emprendieron con objeto de determinar si diferentes hongos fitopatógenos producían durante su proceso degradativo o autólisis, enzimas pécticas capaces de degradar paredes celulares de plantas.

El estudio de la autólisis de estos hongos con especial referencia a la producción de poligalacturonasas (PG y PMG) ha puesto de manifiesto una serie de hechos interesantes en estos procesos degradativos.

AUTOLISIS DE DIFERENTES HONGOS FITOPATOGENOS.

El día de peso máximo o día cero de autólisis tuvo lugar entre los 3 y 7 días de crecimiento, correspondiendo con el agotamiento de la fuente carbonada (Leal y col., 1968). Siendo los valores de glucosa residual inferiores a 0,3 mg/ml lo que representa un consumo de la glucosa inicial de un 97% o mayor al iniciarse la autólisis. Solamente en el caso del hongo Cladosporium cucumerinum el consumo de glucosa fue de un 83%, pero éste llegó a ser de un 97% en los primeros días de autólisis.

En la mayoría de los hongos transcurre a un pH neutro o ligeramente básico. La autólisis de los hongos estudiados que pertenecen a los Mucorales tuvo lugar a pH ácido.

El grado de autólisis o pérdida que experimenta

el peso seco del micelio con el tiempo de incubación, está muy relacionada con el pH al cual transcurre este proceso. Lahoz y col. (1979) encontraron en Aspergillus niger una relación lineal entre pH y grado de autólisis, siendo mayor este a medida que aumentaba el pH. Nosotros al estudiar la autólisis de diferentes hongos, encontramos que la autólisis natural transcurría a diferentes pHs y no observamos una relación lineal entre pH y grado de autólisis. Trichoderma viride y Fusarium oxysporum alcanzan grados de autólisis de un 70% y estos procesos transcurren a pH ligeramente ácido (6,2) y ligeramente básico (7,7) respectivamente. En el caso de los Mucorales, cuyas autólisis transcurren a pH ácido, se obtienen grados de autólisis de un 50%. El resto de los hongos estudiados alcanza un grado de autólisis de alrededor del 50%.

Berh (1930) observó que la autólisis en medio ácido es mucho más lenta y alcanza grados de autólisis muy inferiores a los alcanzados en medio alcalino. Ritter (1955) obtuvo un grado de autólisis de un 17,6% para Aspergillus niger y Lahoz y col. (1967) obtuvieron un grado de autólisis de un 14,6% para A.terreus. Estos resultados parecen oponerse a los encontrados por nosotros para los hongos pertenecientes a los Mucorales.

PRODUCCION DE ENZIMAS PECTICAS.

Las enzimas pécticas han sido agrupadas de acuer-

do a los siguientes criterios (Bateman y Basham, 1976; Rexova-Benkova y Marcovic, 1976):

- 1º Enzimas capaces de romper enlaces glicosídicos en posición 1,4- α , hidrolíticas o liásicas.
- 2º Especificidad del enzima para un sustrato determinado, pectina o ácido péctico.
- 3º Según la posición en que ocurre la ruptura de la cadena péctica, en posición terminal o al azar en cualquier punto de la cadena.

Como enzimas hidrolíticas hemos estudiado poligalacturonasa (PG) y polimetilgalacturonasa (PMG), según el sustrato sobre el que actúan.

Como enzimas liásicas hemos estudiado pectatoliasa (PAL) y pectinliasa (PL), según la especificidad por el sustrato.

También se ha estudiado la disminución de la viscosidad, efecto que corresponde a una actividad endo, sobre los dos sustratos.

En primer lugar estudiamos las variaciones de las actividades PG y PMG durante la autólisis de diferentes hongos fitopatógenos.

Todos los hongos estudiados producen en mayor o menor proporción PG y PMG durante el proceso degradativo. Es

te hecho nos hizo pensar en una síntesis basal de estas enzimas, al crecer los hongos en un medio que contiene glucosa como fuente de carbono (Cooper, 1977) y como en la mayoría de los casos, su actividad aumenta bastante en el líquido de cultivo durante la autólisis, la síntesis de estas enzimas podría ser autoinducida en el proceso degradativo. Esto podría poner de manifiesto alguna relación entre autólisis y patogenicidad, es decir una mayor capacidad patogénica del hongo en su fase degradativa.

Los hongos que pertenecen al mismo género han tenido un comportamiento muy similar en diferentes parámetros: grado de autólisis, pH al cual ocurre la fase degradativa, y producción de enzimas pécticas (PG y PMG).

En cuanto a las actividades pécticas podemos observar como en los dos hongos del género Cladosporium el comportamiento es bastante similar, encontrándose las actividades en cultivos muy autolizados, lo mismo podemos señalar en el caso de los dos hongos del género Fusarium, y del género Cunninghamella. En los dos Rhizopus la actividad PG es bastante similar pero la actividad PMG es mayor en R. arrhizus.

SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO.

Entre los hongos estudiados destacaron tres por su mayor producción de enzimas pécticas: Alternaria alternata, Mucor rouxii y Rhizopus arrhizus. Entre estos hongos fue elegido A. alternata, por presentar mayores actividades PG y

PMG en su proceso degradativo, para estudiar la inducción de enzimas pécticas en presencia de pectina durante su autólisis.

Alternaria alternata.

Es interesante destacar la presencia de pequeñas cantidades de ácido galacturónico en los hidrolizados tanto de micelio como en el líquido de cultivo de A.alternata, de cultivos autolizados de 27 días en medios sin pectina, lo cual puede estar relacionado con la inducción de la actividad de enzimas pécticas en el proceso degradativo (pag.132).

La síntesis de enzimas pécticas fue inducida creciendo el microorganismo en presencia de pectina, se utilizaron cuatro concentraciones distintas de pectina, suplementado con glucosa hasta una concentración final de la fuente carbonada del 1%.

El incremento medio de las actividades PG, PMG, PAL, y PL en los medios I,II, III y IV con relación al cultivo inicial (sin pectina) fue de:

<u>MEDIO</u>	<u>PG</u>	<u>PMG</u>	<u>PAL</u>	<u>PL</u>
I	20	8	3	5
II	23	8	4	5
III	19	7	4	6
IV	15	6	5	5

La enzima que ha presentado una respuesta mayor al efecto inductivo, ha sido la actividad PG, seguido de la ac-

tividad PMG. La respuesta a la inducción de PL y PAL ha sido menor.

El incremento en la concentración de pectina no produce un aumento directo en las actividades pécticas, incluso se observa un efecto inhibitor para concentraciones elevadas de pectina. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la concentración de pectina y glucosa en el medio era la misma, medio II. De un modo análogo a lo que ocurre en medios sin pectina, los hidrolizados de paredes y líquido metabólico de cultivos autolizados de 27 días, en el medio II, presentan ácido galacturónico en mayor cantidad.

La presencia de pectina en el medio de cultivo produce un efecto inductor también sobre la actividad 1,3- β -glucanasa, intimamente relacionada con la lisis de los 1,3- β -glucanos de la pared celular de la mayoría de los hongos filamentosos. La media de la actividad fue aproximadamente duplicada.

En los medios con pectina se observa una subida gradual del pH al cual transcurre la autólisis al aumentar la concentración de pectina en el medio. Los grados de autólisis alcanzados no varían prácticamente de los obtenidos en medios sin pectina.

Las actividades "endo", reducción de la viscosidad, frente a la pectina y frente al ácido poligalacturónico, aumentan al aumentar la concentración de pectina en el medio cuando el sustrato es la pectina, pasando de 405 a 506 U/mg de proteína, mientras que la actividad frente al ácido poli-

galacturónico se mantiene más constante.

En general las actividades más altas se obtienen a la mitad del proceso degradativo, y la actividad endo frente al ácido poligalacturónico llega a desaparecer al final de la autólisis, posiblemente la inactivación o inhibición de la enzima se debe a algún producto metabólico (represión catabólica) o a la degradación de la misma por alguna enzima proteolítica, que con frecuencia aparecen en los procesos degradativos (Reyes y col., 1969).

Entre las enzimas implicadas en la degradación de la pared celular y citoplasma se determinaron además las siguientes actividades: Invertasa, α -amilasa, celulasa, fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, 1,3-4- β -glucanasa, 1,6- β -glucanasa, dextranasa y quitinasa.

Contrariamente a lo que ocurre con la actividad 1, 3- β -glucanasa, estas actividades disminuyen a medida que aumenta la concentración de pectina en el medio, siendo la actividad invertásica donde el efecto es más patente que pasa de una actividad de 275 mU/mg de proteína a 33 mU/mg de proteína.

El medio que contiene 0,5% de glucosa y 0,5% de pectina fue elegido para obtener enzimas líticas de A.alternata. El complejo enzimático fue obtenido de cultivos de 27 días, autolizados entre un 25 y un 30%; en este medio de cultivo, las actividades más altas corresponden a PG y PMG y a las actividades endo. Las actividades liásicas son inferiores y

los niveles se mantienen constantes durante todo el proceso.

ESTUDIO DEL COMPLEJO ENZIMATICO.

Las enzimas de A.alternata se precipitaron con ácido tánico y se lavaron con acetona fría para eliminar taninos, Esta precipitación parece que no influye sobre la actividad de las enzimas extracelulares producidas por este hongo e implicadas en la degradación de la pectina y el ácido poligalacturónico. Byrde y col. (1960) demostraron que enzimas pécticas extracelulares de Sclerotinia fructigena eran inactivadas por compuestos, que no eran necesariamente tóxicos in vivo como los taninos. Con objeto de determinar si las enzimas pécticas eran inactivadas por el ácido tánico, se realizó una precipitación con ácido tánico y paralelamente otra con acetona (Zalewska-Sobczak y Urbanek,1975), alcanzándose en ambos casos un grado de recuperación semejante de las actividades enzimáticas existentes.(Tabla XVII).

El incremento lineal de las diferentes actividades enzimáticas con la concentración de proteínas, justifica que los experimentos son reproducibles a diferentes concentraciones de proteínas así como la ausencia de algún inhibidor para estas enzimas pécticas (Reyes y col.,1984).

Entre las actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de las sustancias pécticas, la pectinesterasa no fue estudiada por no presentar actividad salvo en alguna ocasión en cantidades poco significativas, análogamente a lo

encontrado por Shastri (1980) en este mismo hongo y lo encontrado por Martínez y col. (1982) para Botrytis cinerea.

Es interesante considerar los trabajos sobre la producción de enzimas pécticas de Alternaria solani y A.tenuis realizados por Metha y col.(1975,1975) sobre diferentes medios de cultivo y a diferentes pHs, pero poco hay descrito sobre enzimas pécticas de A.alternata, exceptuando los trabajos de Shastri y col. (1980); encontraron que en un medio con pectina y celulosa obtenían la máxima producción de enzimas PG y PMG a los 4 y 7 días de crecimiento respectivamente. Análogamente a lo encontrado por nosotros , un incremento en la concentración de pectina induce, hasta cierto punto, la mayor producción de PG y PMG, encontrando a concentraciones elevadas menores actividades.

Metha y col. (1975) ponen de manifiesto que la producción de enzimas pécticas por A.solani y A.tenuis en un medio con glucosa, puede ser debida a la naturaleza constitutiva de estas enzimas y la presencia de sustancias pécticas en el medio como pectina o polipectato sódico, que incrementan la producción de enzimas pécticas, puede ser considerada simplemente como una estimulación de la síntesis.

La presencia de ácido galacturónico tanto en hidrolizados de micelio joven como en líquidos de cultivo autolizados de A.alternata en medios con glucosa, nos hizo dudar si habría una verdadera síntesis basal o constitutiva de enzimas pécticas, como podría deducirse de los resultados obte

nidos al crecer y autolizar el hongo empleando glucosa como fuente de carbono. Por esta razón consideramos como inductivas las enzimas pécticas producidas por A.alternata, análogamente a lo encontrado por Bateman (1966) para Fusarium solani f. phaseoli y por Sadarivan y Subramaniam (1963) para Fusarium moniliforme y Sclerotium rolfsii.

Para determinar la existencia de actividades liásicas e hidrolíticas presentes frente a la pectina y al ácido poligalacturónico, los productos de la reacción enzimática fueron analizados con ácido tiobarbitúrico (Serwood, 1966). Los máximos de absorción habidos a 510 nm y 547 nm indican la presencia de ambas actividades (fig.7).

CARACTERISTICAS CINETICAS Y FISICAS.

Las constantes cinéticas y físicas estudiadas para las diferentes enzimas pécticas presentes en el complejo enzimático, además de definir sus propiedades nos dan algunas indicaciones sobre este complejo.

Cada una de estas actividades presenta un pH óptimo, excepto la actividad PG que presenta dos pHs óptimos, uno a 3,5 y otro a 5,5 unidades de pH. Dado que la PMG presenta el mismo pH óptimo de actuación (5,5), podríamos pensar que se debe a la presencia de una enzima que actúa frente a los dos sustratos. Según Cooper (1977), la síntesis de un grupo de enzimas relacionadas entre sí, como PG y PMG pueden estar bajo un control coordinado por un solo gen regula-

torio (Myers y Eberhart, 1966). Esta posibilidad está reforzada por recientes observaciones de la dual actividad péctica asociada a una sola fracción enzimática incluso después de estar muy purificadas como ocurre en el caso de PG y PMG de Botrytis cinerea (Urbanek y col. ,1975) y en el caso de la β -N-acetilglucosaminidasa y β -N-acetilgalactosaminidasa de Sclerotinia fructigena (Reyes y Byrde, 1973).

Los dos pHs óptimos determinados para la PG de A.alternata, de 3,5 y 5,5 unidades son muy aproximados a los descritos para otras poligalacturonasas de otros hongos fitopatógenos, podemos citar el pH óptimo de 2,5 de Botrytis cinerea (Martínez y col., 1982), el de 4 de F.oxysporum f. sp. lycopersici (Harman y Coden, 1972), el de 4 de F.tricinatum (Wick y Schroeder,1982), el de 4-4,5 de Coniothyrium diplodielia (Endo,1964) y de 5 de F.roseum (Mullen y Bateman, 1975).

La PMG no es una enzima descrita como tal sino como una PG que actúa frente a un sustrato metilado, su pH óptimo es de 5,5 unidades, similar al obtenido por Martínez y col. (1982) para una PMG de B.cinerea.

El pH óptimo de actuación de la PL y PAL fue de 5,0 y 5,5 respectivamente, los cuales difieren de lo encontrado en la literatura, así Mullen y Bateman (1975) describen una PL de F.roseum con un pH óptimo de 8,5 unidades, Olutiola y Akintunde (1979) PL de P.citrinum con un pH óptimo de 8,0.

Las actividades endo presentan un pH óptimo de 6,0 unidades frente a la pectina, y de 5,0 unidades frente al áci

do poligalacturónico, análogo a lo encontrado por Brookhou-ser y col. (1980) para una endo -PG de Rhizostonia solani con un pH óptimo de 5,2. Mehta y col. (1975) describen para Alter-naria solani una endo-PG con un pH óptimo de 4.

Los valores de las Km obtenidos a los distintos pHs óptimos nos indican que la actividad endo frente al ácido po-ligalacturónico tiene una gran afinidad por el sustrato con una Km de 0,36 mM y la actividad PL presenta muy poca afini-dad por el sustrato con una Km de 14,2 mM. Para el resto de las actividades los valores obtenidos de Km fueron alrededor de 3 mM.

Los pesos moleculares y puntos isoeléctricos de las diferentes actividades pécticas fueron:

<u>Actividad</u>	<u>Pm</u>	<u>PI</u>	
PG	72.500	5,06	9,80
PMG	33.800	4,38	9,62
PAL	87.000	6.45	9,62
PL	55.000	5,79	9,62
Endo-ác.polig.	131.000		9.04
Endo-pectina	16.200	3,38	9,04

Las actividades PG, PMG, PAL y PL presentan la ac-tividad mayoritaria en el PI entre 5 y 7, siendo la actividad que corresponde al PI por encima de 9 menor.

La enzima endo-ácido poligalácturónico presenta

su única actividad en el PI 9,04 mientras que la actividad endo-pectina presenta dos picos que corresponden con los PI de 3,3 y 9.04.

Resultados similares ha encontrado Fielding (1981) para una gran cantidad de hongos patógenos, describe una PG principal para seis especies de Monilinia con PI entre 9 y 10, y cuatro de ellas presentan además una pequeña actividad PG de PI comprendido entre 5 y 7.

De un modo similar describe cuatro cepas de Botrytis cinerea con una PG de PI entre 8 y 9,7 y tres de ellas además una pequeña actividad de PI entre 5 y 7.

El estudio de la movilidad de estas proteínas en geles de poliacrilamida al 7% nos revela la presencia de una banda mayoritaria y otras bandas de menor intensidad a lo largo del gel, esta banda mayoritaria está localizada próxima al comienzo del gel con un Rf de 0,143. El introducir en los geles de poliarilamida una concentración de pectina del 0,1 % no produce una alteración sustancial en la resolución de las bandas, su velocidad de migración disminuye en el gel aunque su movilidad relativa permanece constante, (fig.33 y 34).

La detección de las actividades enzimáticas en estos geles, revelando con rojo de rutenio, nos indica la existencia de cuatro bandas de actividad, localizadas en el comienzo del gel con unos Rf de 0,043, 0,095, 0,143 y 0,214 que corresponden con los Rf de la banda mayoritaria y de las más

próximas a ella en el gel revelado para proteínas totales (fig. 34).

La segunda banda de actividad con un Rf de 0,095 es inhibida por iones Ca lo que se pone de manifiesto cuando incubamos el gel en presencia de este ión (fig. 34-A-2 y 34-B-2). Esta actividad que es inhibida por Ca corresponde a la PL tal como comprobamos por la ausencia de incremento en la absorción a 235 nm. cuando valoramos la actividad enzimática en presencia de iones Ca , fenómeno que también ha sido observado por Albersheim y col. (1962) para PL de hongos, en contraposición de lo descrito para bacterias.

MACERACION DE TEJIDOS.

La maceración de tejidos vegetales representa un fenómeno asociado con la patogénesis por numerosos microorganismos fitopatógenos (Bateman y Millar, 1966; Wood, 1960).

Este proceso implica la separación de las células. La base enzimática de la maceración fue claramente establecida por Brown (1915) atribuyéndose a la digestión de la lámina media. Está actualmente claro que las enzimas endo-pécticas son las responsables de la maceración (Bateman, 1968; Byrde, 1968; Mount y col. 1970; Bateman, 1971, 1972).

La maceración de tejido de patata, tomate y zanahoria con separación de células libres por enzimas líticas de A.alternata puede verse en la fig. 37.

En tomate el mayor número de células desprendidas se obtuvo cuando el correspondiente tejido era atacado por el complejo enzimático en presencia de tampón de McIlvaine y para patata y zanahoria en agua. En tomate se logró un gran volumen de células desprendidas después de 5 horas de incubación, pero los blancos o controles fueron también altos. En patata se halló un gran volumen de células desprendidas pero los blancos o controles fueron inapreciables.

En los experimentos realizados con zanahoria hubo maceración de tejido, en contraposición con lo descrito por Tribe (1955), Martínez y col. (1982) para Botrytis cinerea y para otros hongos por Fushtey (1957).

En el líquido sobrenadante de la maceración de los tres tejidos se observó, respecto al blanco control, un ligero aumento en la conductividad, sustancias reductoras y ácido galacturónico.

En tomate el mayor aumento de sustancias reductoras y ácido galacturónico se obtuvo cuando la maceración se realizó en tampón citrato-fosfato-borato 50 mM y pH 5,5, pero el mayor número de células desprendidas fue en el tampón de McIlvaine y el de ácido galacturónico en agua. En zanahoria el mayor aumento de sustancias reductoras fue en agua y el de ácido galacturónico en McIlvaine.

En ningún caso las células se teñían con rojo neutro, lo cual parece indicar que son células muertas. Aunque

está claro que las enzimas pécticas no interaccionan con el plasmalema (Basham y Bateman, 1975 b) producen un daño indirecto sobre la membrana con una gran pérdida de electrolitos y consecuentemente la muerte celular.

Algunos investigadores han encontrado que hay maceración de tejidos antes que las células mueran (Tribe, 1955; Hall y Wood, 1973), nosotros podemos confirmar esta hipótesis ya que es posible en condiciones osmóticamente adecuadas obtener maceración de tejidos y protoplastos viables.

Un hecho interesante es el mayor grado de maceración del tejido de patata cuando se emplea agua y en el caso de la zanahoria el único medio donde se produce maceración. Esto nos hizo pensar que en ambos tampones la presencia de citrato podría tener algún efecto quelante sobre algún ión divalente necesario para una determinada actividad enzimática, esta enzima sería imprescindible en la maceración de tejidos de zanahoria.

Comparando las sustancias reductoras liberadas del tejido de zanahoria cuando este se somete a la acción enzimática en agua (20 μ mol/ml.) con las sustancias reductoras presentés en el control (4,5 μ mol/ml.) y puesto que el nivel de ácido galacturónico es en ambos casos semejante, parece lógico pensar que la enzima responsable de la maceración es una endo-PG o endo-PL o por lo menos que la maceración se produce ya con simplemente una actividad de tipo endo. Sobre el

tejido de zanahoria la actividad exo parece inapreciable. Es te aparentemente distinto comportamiento del complejo enzimático frente a los distintos tejidos vegetales podría justificarse por las distintas composiciones de los tejidos. Muchos autores han caracterizado las enzimas responsables de la maceración, así Ishii (1976) encontró que la maceración del tejido de patata y cebolla era mayor con una endo-PL de A.japonicus que con una endo-PG del mismo hongo, sin embargo la maceración del rábano era la misma. Bateman (1963, 1968) caracteriza la enzima responsable de la maceración como una endo-PG, Bush y Codner (1968) como una endo-PL y Basham y Bateman (1975), Mount, Bateman y Basham (1970) como una endo-PAL.

OBTENCION DE PROTOPLASTOS.

Las enzimas pécticas, particularmente las endo-PG y endo-PL, de A.alternata son capaces de atacar los tejidos de patata, zanahoria y tomate permitiendo que otros polímeros de la pared, celulosa, sean susceptibles del ataque enzimático y de esta manera hemos podido obtener en medios osmoticamente edecuadaos protoplastos de patata, tomate y zanahoria.

La producción de protoplastos de un tejido vegetal depende de la proporción entre celulasas y pectinasas, parece que esta relación es más adecuada para obtener protoplasas

tos de tomate ya que concentraciones relativamente bajas, 0,25 mg/ml de enzima en un período de incubación de 3 horas es suficiente para la obtención de protoplastos de tomate, necesitando el tejido de patata y zanahoria unas 5 horas de incubación y concentraciones de enzima de 1 mg/ml.

El hecho de obtener protoplastos nos confirma la hipótesis de Basham y Bateman (1975) de que la estabilidad de los protoplastos aislados frente a enzimas pécticas debe ser debida a que no hay una interacción directa significativa entre las enzimas pécticas y el plasmalema. La digestión de la pared por las enzimas pécticas en condiciones osmóticas apropiadas evita la muerte de la célula obteniéndose protoplastos del tejido vegetal.

CONCLUSIONES

- 1º- Los 12 hongos fitopatógenos estudiados producen enzimas pécticas, PG y PMG durante el proceso degradativo en un medio con glucosa como fuente de carbono.
- 2º- Los hongos que pertenecen al mismo género han tenido un comportamiento similar respecto a los grados de autolisis alcanzados, pH al cual transcurre el proceso degradativo y producción de enzimas pécticas.
- 3º- El día de peso máximo o día cero de autólisis tiene lugar para todos los hongos estudiados entre los días 3 y 7 de crecimiento, correspondiendo con el agotamiento de la fuente carbonada.
- 4º- El hongo Alternaria alternata fue el que mayores niveles de PG y PMG produjo en su proceso degradativo natural.
- 5º- La presencia de ácido galacturónico en las paredes celulares y líquidos de cultivo autolizados de A.alternata en medios con glucosa, nos permite considerar la inducción de estas enzimas en el proceso degradativo.
- 6º- Todas las actividades pécticas aumentaron en presencia de pectina en el medio, siendo las actividades endo y la PG las de mayor respuesta.
- 7º- El efecto inductor de la pectina no es proporcional a la concentración de pectina, observándose un efecto inhibitorio para concentraciones altas.

- 8º - El grado de autólisis no varía al aumentar la concentración de pectina.
- 9º - La pectina produce un efecto inhibidor para aquellas actividades no pécticas excepto para la 1,3- β -glucanasa.
- 10º- Las constantes físicas P_m , P_i , K_m , y pH óptimo han sido determinadas para PG, PMG, PAL, PL y actividades endo frente a la pectina y al ácido poligalacturónico.
- 11º- Se pueden detectar actividades pécticas en geles de poliacrilamida con cantidades muy pequeñas de proteínas.
- 12º- La actividad PL es inhibida por iones Ca.
- 13º- El complejo enzimático de A.alternata es capaz de macerar tejidos de tomate, patata y zanahoria.
- 14º- El complejo enzimático de A.alternata es capaz de liberar protoplastos de tejidos vegetales en condiciones osmóticamente apropiadas.
- 15º- Posible uso de este complejo enzimático en la producción de protoplastos de plantas y su comercialización.

VI.- BIBLIOGRAFIA

Albersheim, P., Jones, T.M. y English, P.D., (1969).

Biochemistry of the cell wall in relation to infective processes. Ann. Rev. Phytopathol. 7 , 171-194.

Andrews, P., (1965). The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-606.

Arima, K., Uozumi, T., y Takahashi, N., (1965). Studies of the autolysis of Aspergillus oryzae. I. Conditions of autolysis. Agr. Biol. Chem. 29, 1033-1041.

Arx, J.A. von, (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer. Vaduz.

Bainbridge, B.W., Bull, A.T., Pirt, S.T., Rowley, B.I. y Trinci, A.P.I., (1971). Biochemical and structural changes in non-growing maintained and autolysig cultures of Aspergillus nidulans. Trans. Br. mycol Soc. 56, 371-385.

Bartnicki-García, S., (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annu. Rev. Microbiol. 22 , 87-108.

Basham, H.G. y Bateman, D.F., (1975). Killing of plants cells by pectic enzymes: the lack of direct injurious interation between pectic enzymes or their soluble reaction products and plant cells. Phytopathology, 65 , 141-153.

Bateman, D.F., (1966). Hydrolytic and transeliminative degradation of pectic substances by extracellular enzymes of Fusa-

rium solani f. phaseoli. *Phytopathology*, 56, 238-244.

Bateman,D.F.,(1972). The polygalacturonase complex produced by Sclerotium rolfsii. *Phisiol. Plant Pathol.*,2 , 175-184.

Bateman.D.F. y Millar, R.L., (1966). Pectic enzymes in tissue degradation. *Ann. Rev. Phytopathol.*,4, 119-146.

Bateman,D.F. y Basham,H.G.,(1976). Degradation of plant cell walls and membranes by microbial enzymes. *Enciclopedic of plants physiology. Vol IV. Physiological plant pathology*.Ed. R. Heitefuss y P.H. Willians, 316-355. Springer-Verlag.Ber-ling.

Bauer,W.D., Talmadge,K.W. , Keegstra,K.y Albersheim,P.,(1973) The structure of plant cell wall. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Phy-siol.*,51 , 174-187.

Behr, G., (1930). Uber Autolyse bei Aspergillus niger. *Arch. Mikrobiol.*,1, 418-444.

Bilai,V.J., Zakorodonez,L.A. y Soerbina, S.M.,(1972). Effect of autolysis on yield of amino acid and groups B vitamins in Fusarium moniliforme. *Mikrobiol. J. (Kiew)*, 34, 292-296.

Boyle,C.,(1924). Studies the physiology of parasitism. X. The growth reactions of certain fungi to their staling products. *Ann. Bot.*, 38, 113-136.

Block,R.G., Durrum,E.L., Zweiz,G.,(1958). A manual of paper

chromatography and paper electrophoresis. 2ª Ed. New York.
Academic Press. Inc.

Brenner, W. (1914). Die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze.
Zbl. Bakteriologie, II, 40, 555-647

Brightwell, R., y Tappel, A., (1968). Lysosomal acid pyrophosphatase and acid phosphatase. Arch. Biochem. Biophys., 124, 333-334.

Brookhouser, L.W., Hancock, J.G y Weinhold, A.R., (1980). Characterization of endopolygalacturonase produced by Rhizoctonia solani in culture and during infection of cotton seedlings. Phytopathology, 70, 1039-1042.

Brown, W., (1915). Studies in the physiology of parasitism. I. The action of Botrytis cinerea. Ann. Bot., 29, 313-348.

Brown, W., (1923). Ann. Bot. 37, 105-129.

Bull, A., (1972). Environmental factors influencing the synthesis and excretion of exocellular molecules. J. Appl. Chemistry and Biotechnology, 22, 261-298.

Burnett, J.H., (1979). Aspects of the structure and growth of hyphal walls. En: Fungal wall and hyphal growth. Ed. J.H. Burnett y A.P.J. Trinci, 1-25. Cambridge University Press. Cambridge, London, New York, Melbourne.

Byrde, R.J.W., Fielding, A.H. y Willians, A.H., (1960). The role of oxidized polyphenols in the varietal resistance of apples

to brown rot. In: Phenolics in plants in health and disease, 245-249. Ed. Pridhan, J.B.. Pergamon Press.

Byrde, R.J.W., (1979). Role of polysaccharide-degrading enzymes in microbial pathogenicity. En: Microbial polysaccharides and polysaccharidases. Ed. R.C.W. Berkeley, G.W., Gooday y D.C. Ellwood., 417-436. London, U.K. Academic Press.

Cochrane, V.W., (1958). Nitrogen nutrition and metabolism. En: Physiology of Fungi. Ed. J. Wiley y Sons, 241-249.

Cooper, R.M., (1975). Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes by Verticillium albo-atrum and Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Physiol. Plant Pathol., 5, 135-156.

Cooper, R.M., (1977). Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes of plant pathogens. En: Cell wall biochemistry. Ed. B. Solheim y J. Roa, 163-211.

Chang, S.C., (1940). Soil Science, 49, 197-210.

Chang, P.L.Y. y Trevithick, J.R., (1974). How important is secretion of exoenzymes through apical cell walls of fungi. Arch. Microbiol., 101, 281-293.

Clark, W.M. y Lubs, H.A., (1917). The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its applications in bacteriology. J. Bac., 2, 1.

Cruickshank, R.H., y Wade, G.C., (1980). Detection of Pectic enzymes in Acrylamide Gels. Anal. Biochem., 107, 177-181.

Davis, B.J., (1964). Disc Electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad. Sci., 121, 404-427.

Domsch, K.H., Gams, W. y Anderson, T.H., (1981). Compendium of soil fungi. London .Academic Press.

Dox, A. W. y Maynard, L., (1912). Autolysis of mold cultures. J. Biol. Chem., 12, 227-231.

Dox, A.W., (1913). Autolysis of mold cultures.II. Influence of exhaustion of the medium upon the rate of autolysis of Aspergillus niger. J. Biol. Chem., 16, 479-484.

Emiliani, E. y Parera, J.N., (1958). Estudio sobre la inducción de la autolisis en una cepa de Aspergillus niger.II. Examen preliminar de varios grupos de sustancias nitrogenadas e identificación de los aminoácidos del autolizado. Rev. Fac. Ing. Quim., 27, 99-112.

Emiliani, E. y Ucha de Davie, I., (1962). Induced autolysis of Aspergillus phoenicis (A.niger group). IV. Carbohydrates. Appl. Microbiol., 10, 504-512.

Endo, A., (1964). Studies on Pectolytic enzymes of mold. Part XI. Purification and properties of exo-polygalacturonase. Agr. Biol. Chem., 28, 639-645.

English, P.D., Jurale, J.B. y Albersheim, P., (1971). Host pa-

thogen interactions. II. Parameters affecting polysaccharide degrading enzymes secretion by Colletotrichum lindemuthianum grown in culture. Plant physiol., 47, 1-6.

English, P.D., Maglothin, A., Keegstra, K. y Albersheim, P., (1972). A cell wall degrading endo-PG by Colletotrichum lindemuthianum . Plant physiol., 49, 293-297.

Fencel Z., (1978). Cell ageing and autolysis. En: The Filamentous fungi. V.3. Developmental mycology. Ed. J.E. Smith y D. R. Berry. Publishers by Edward Arnold.

Foster, J.W., (1949). Chemical Activities of Fungi. Academic Press. New York.

Fushtey, S.G., (1957). Studies in the physiology of parasitism XXIV. Furter experiments on the killing of plants cells by fungal and bacterial extracts. Ann. Bot., 21, 273-286.

Gunasekaban, M., Hess, W.M. y Weber, D.J., (1973). Ultrastructure and lipid changes in Pyrenochaeta terrestris during aging. Can. J. Microbiol., 19, 491-496.

Hall, J.A. y Wood , R.K.S., (1973). The killing of plant cells by pectolytic enzymes. En: Fungal pathogenicity and the plant's response, 19-38. Ed. R.J.W. Byrde y C.V. Cutting. Academic Press, London.

Harman, G.E. y Coden, M.E., (1972). Purification and partial characterization of the polygalacturonases produced by Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. Biochim. Biophys. Acta,

264, 328-338.

Hislop, E.C., Keon, J.P.R. y Fielding, A.H., (1979). Effects of pectin-lyases from Monilinia fructigena on viability, ultrastructure and localization of acid phosphatase of cultured apple cells. *Physiol. Plant Pathol*, 14, 371-381.

Hockenhull, D.J.D., (1946). Studies in penicillium production by P.notatum. I. Preliminar study of the metabolism of carbon, nitrogen, sulphur and phosphorous. *Biochem. J.*, 40, 337-343.

Hockenhull, D.J.D., (1950). Studies in the metabolism of mould fungi. I. A preliminar study of the metabolism of carbon, nitrogen and sulphur by Aspergillus nidulans. *J. Exp. Botany*, 1, 194-200.

Hofsten, B.V. y Hofsten, A.V., (1974). Ultrastructure of a thermotolerant basidiomycete possibly suitable for production of food protein. *Appl. Microbiol.*, 27, 1142-1148.

Hunsley, D. y Burnett, J.H., (1970). The ultrastructural architecture of the wall of some hyphal fungi. *J. Gen. Microbiol.* 62, 203-218.

Hulme, M.A. t Strauks, D.W., (1971). Regulation of cellulase production by Myrothecium verrucaria grown on non-cellulosic substrates. *J. Gen. Microbiol.*, 69, 145-155.

Ishii, S., (1976). Enzymatic maceration of plant tissues by

endo-pectin lyase and endo-poligalacturonase from Aspergillus japonicus . Phytopathology, 66, 281-289.

Iten, W. y Matile, P., (1970). Role of chitinase and other lysosomal enzymes of Coprinus lagopus in the autolysis of fruiting bodies. J. Gen. Microbiol., 61, 301-309.

Janszen, F.H. y Wessells, J.G.H., (1970). Enzymic dissolution of hyphal septa in a basidiomycete. Antonis van Leeuwenhoek, 36, 255-257.

Jeanes, A., (1951). Ann. Chem., 23, 415.

Jeuniaux, D., (1966). Chitinases. Methods in enzymology, 8, 644-650.

Kabat, y Mayer's, (1961). Dische colorimetric carbazole methods. 2^a ed.

Keen, N.T., y Erwin, D.C., (1971). Endopolygalacturonase: evidence against involvement in Verticillium wilt of cotton. Phytopathology, 61, 198-203.

Keen, N.T. y Horton, J.C., (1966). Induction and repression of endo-polygalacturonase synthesis by Pyrenochaeta terrestris. Can. J. Microbiol., 12, 443-453.

Kuo, M.J. y Alexander, M., (1967). Inhibition of the lysis of fungi by melanins. J. Bacteriol., 94, 624-629.

Lahoz, R., Reyes, F. y Beltrá, R., (1966). Some chemical chan

ges in the micelium of Aspergillus flavus during autolysis.

J. Gen. Microbiol., 45, 41-49.

Lahoz, R., (1967). Quantitative changes in the content of non nitrogenous compounds during autolysis of Aspergillus terreus.

J. Gen. Microbiol., 46, 451-456.

Lahoz, R. y González-Ibeas, J., (1968). The autolysis of Aspergillus flavus in an alkaline medium. J. Gen. Microbiol., 53, 101-108.

Lahoz, R., Reyes, F. y Ballesteros, A.M. (1969). Chemical and physiological changes in fungi during autolysis.V. Furter observations on the autolysis of Aspergillus flavus. Mycopath. Mycol. Appl., 38 , 367-372.

Lahoz, R., y Miralles, M., (1970). Influence of the carbon source on the autolysis of Aspergillus niger. J. Gen. Microbiol., 62, 271-276.

Lahoz, R., Ballesteros, A.M. y González-Ibeas, J., (1971). Chemical and physiological changes in filamentous fungi during autolysis.X. Changes in the concentration of polyol in autolysing cultures of several fungi. Mucopath. Mycol. Appl., 43, 223-228.

Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.S., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265.

Lisker, N. y Retig, N., (1974). Detection of polygalacturonase and pectin lyase isoenzymes in polyacrylamide gels. J. Chromatography, 96, 245-249.

Magro, P., Di Lenna, P., Marciano, P y Pallavicini, C., (1980). Variability of polygalacturonase and protein Isoelectric Focusing Patterns in Botrytis cinerea Isolates. J. Gen. Microbiol, 120, 105-109.

Marcus, L., Schejter, A., (1983). Single step chromatographic purification and characterization of the endo-polygalacturonases and pectinases of the fungus, Botrytis cinerea Pers. Physiol. Plant Pathol., 22, 1-13.

Mandels, R.G., (1965). The Fungi. I. Ed. Ainsworth, G.C. y Sussman, A.S. Academic Press, N.Y. 559.

Mandels, M. y Reese, E.T., (1960). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol., 79, 816-826.

Martínez, M.J., Reyes, F. y Lahoz, R.; (1982). Cell wall plant polysaccharide-degrading enzymes in autolysis of Botrytis cinerea . Trans. Br. mycol. Soc., 78, 395-403.

Matile, P., (1969). Prospects of yeast cytology. Antonie van Leeuwenhoek, 35, Suppl.: Yeast Symposium 1969, 59-70.

McCledon, J.H., (1964). Evidence for the pectic nature of the middle lamella of potato tuber cell walls based on chromatography of macerating enzymes. Ann. J. Bot., 51, 628-633.

McComb, E.A., McCready, R.M., (1952). Colorimetric Determination of Pectic substances. Anal. Chem., 24 (10), 1630-1632.

Mehta, P., Vyas, K.M. y Saksena, S.B., (1975). Effect of native carbon sources and pH on the pectolytic enzymes of Alternaria solani and A.tenuis . Proceedings of the Indian National Science Academy, 40, 433-439.

Mehta, P., Vyas, K.M. y Saksena, S.B., (1975). Production of pectolytic enzymes by Alternaria solani and Alternaria tenuis on different culture media. J. Indian Bot. Soc., 54, 200-206.

Metzenberg, R.L., (1962). The localization of β -fructofuranosidase in Neurospora . Arch. Biochem. Biophys., 96, 468-474.

Michalenko, G.O. Hohl, H.R. y Rast, D. (1976). Chemistry and architecture of the micelial wall of Agaricus bisporus. J.Gen. Microbiol, 92, 251-262.

Michel-Durand, E., (1938). Bull.Soc. Chem. Biol., 20, 399-412.

Mount, M.S., Bateman, D.F. y Basham, H.G., (1970). Induction of electrolyte loss, tissue maceration and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans eliminase. Phytopathology, 60, 924-931.

Mühlethaler, K., (1967). Ultrastructure and formation of plant cell walls. Ann. Rev. Plant Physiol., 18, 1-24.

Mullen, J.M. y Bateman, D.F., (1975). Polysaccharide degrading enzymes produced by Fusarium roseum avenaceum in cul-

ture and during pathogenesis. *Physiol. Plant Pathol.*, 6, 233-246.

Myers, M.G. y Eberhart, B., (1966). Regulation of cellulase and cellobioase in Neurospora crassa. *Biochim. Biophys. Acta*, 24, 782-785.

Nagasaki, S., (1968). Physiological aspects of various enzymes in relation to the culture age of Aspergillus niger mycelia. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 14, 147-161.

Nakao, Y., Imada, A. Wada, T y Oyata, K. (1964). Degradation of nucleic acids and their related compounds by microbial enzymes. XVI. Excretion of mononucleotides by yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, 28, 151-159.

Nelson, H., (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153 375-380.

Neukon, H., (1960). Über farbreaktionen von urosäuren mit thio_{barbitursäure}. *Chimia*, 14, 165-167.

Northcote, D.H., (1963). The biology and chemistry of the cell walls of higher plants, algae and fungi. *Int. Rev. Cytol.*, 14 223-265.

Olutiola, P.O. y Akintunde, O.A., (1979). Pectin lyase and pectin methylesterase production by Penicillium citrinum. *Trans. Br. mycol. Soc.*, 72, 49-55.

Ornstein, L., (1961). Disc electrophoresis I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349.

Page, O.T., (1961). Quantitative paper chromatographic techniques for the assay of products of polygalacturonase activity of fungus cultures. Phytopathology, 51, 337-338.

Paigen, K. y Willians, B., (1970). Catabolite represion and other control mechanism in carbohydrate utilization. Adv. Microb. Physiol., 4, 251-323.

Paul, C., (1970). Ein Beitrag zur autolyse von boden-pilzen. Zbl. Bakteriol.II, 124, 673-683.

Phaff, H.J., (1947). The production of exocellular pectic enzymes by Penicillium chysogenum.I. On the formation and adaptation nature of polygalacturonase and pectinesterase. Arch. Biochem., 13, 67-81.

Pérez-Leblic, M.I., Reyes, F. Martínez, M.J. y Lahoz, R., (1982). Cell wall degradation in the autolysis of filamentous fungi. Mycopathology ,80, 147-155.

Pérez-Leblic, M.I., Reyes, F., Lahoz, S. y Archer, S., (1982). Autilysis of Penicillium oxalicum with special reference to its cell walls. Can. J. Microbiol., 28, 1289-1295.

Polachek, Y. y Rosenberger, R.F., (1975). Autolytic enzymes in hyphae of Aspergillus nidulans: Their action on old and newly formed walls. J. Bacteriol., 121, 332-337.

Porter, F.M., (1966). Protease activity in diseased fruits. *Phytopathology*, 56, 1424-1425.

Pratt, C.A., (1924 a). The staling of fungal cultures. I. General and chemical investigations of staling by Fusarium. *Ann Bot.*, 38, 563-595.

Raistrick, H. y Vincent, J.M., (1948). *Biochem. J.*, 43, 90-99.

Reese, E.T., (1977). The structure, biosynthesis and degradation of wood. *Recent advances in phytochemistry*, 11, 311-367.

Reese, E.T., (1972). Enzyme production from insoluble substrates. En: *Enzyme engineering biotechnology and bioengineering symposium vol.3*. Ed. L.B. Wingard, Jr. Interscience Publisher, New York, London, Sydney and Toronto, 43-62.

Rexova-Benkova, L. y Markovic, O., (1976). Pectic enzymes. En: *Advances in Carbohydrate chemistry and Biochemistry*, vol.33, 323-385. Ed. R. Stuart Tipson y D. Horton. Academic Press. New York. San Francisco. London.

Reyes, F. y Byrde, R.J.W., (1973). Partial purification and properties of a β -N-acetylglucosaminidase from the fungus Sclerotinia fructigena. *Biochem. J.*, 131, 381-388.

Reyes, F., y Lahoz, R., (1977). Variations in lysis of walls of Sclerotinia fructigena with age of culture. *J. Gen. Microbiol.*, 98, 607-610.

Reyes, F., Lahoz, R. y Val Moreno, A., (1981). Synthesis of

1,3- β -glucanase and β -N-acetylglucosaminidase during autolysis of Neurospora crassa . J. Gen. Microbiol., 126, 347-353.

Rippel, A. y Behr. G.,(1930). Über die Verteilung des Magnesiums im Pilzmycel. Arch. Mikrobiol., 1, 271-276.

Rippel, A. y Behr, G.,(1936). Arch. Mikrobiol.,7, 584-589.

Ritter, G.E.,(1912). Ammoniak und Nitrate als Stickstoffquelle für Schimmelpilze. Ber. dtsh. Bot. Ges., 29, 570-577.

Ritter, R.,(1955). Physiologische Untersuchungen an Zygomyceten. Arch, Mikrobiol., 22, 248-284.

Sadarivan, T.S. y Subramanian,D.,(1963). Pectic enzymes and plant diseases. J. Indian Bot.Soc., 42, 199-212.

Scala, F., Cristinzio, G., Marziano, F. y Noviello, C.,(1981) Endopolygalacturonase zymograms of Fusarium species. Trans. Br. mycol. Soc., 77(3), 587-591.

Semeniuk,G., (1944). Iowa. State. Coll. J.Sci. 18, 325-358.

Sherwood, R.T., (1966). Pectic lyase and polygalacturonase production by Rhizoctonia solani and other fungi. Phytopathology, 56, 279-285.

Shastri, N.N.,(1980). Studies on extracellular production of pectolytic enzymes by a strain of Alternaria alternata. Indian J. Microbiol., 20, 211-215.

Shibata, y Nisizawa, K., (1965). Arch. Biochem. Biophys.,
109, 516.

Somogyi, M., (1945). A new reagent for the determination of
sugars. J. Biol. Chem., 160, 61-73.

Spalding, D.H., (1963). Production of pectinolytic and cellu-
lotytic enzymes by Rhizopus stolonifer . Phytopathology. 53,
929-931.

Spalding, D.H., (1969). Toxic effects of macerating action for
extracts of sweet potatoes rotted by Rhizopus stolonifer and
its inhibition by cations. Phytopathology, 59, 685-692.

Spalding, D.H., y Abdul-Baki, A.A., (1973). In vitro and in
vivo production of pectin lyase by Penicillium expansum. Phy-
topathology, 63, 231-235.

Stegeman, H. von, (1967). Enzym-Elektrophorese in Einschlus-
B-Polymerisaten des Acrylamids β -polygalkturonasen (Pektina-
sen). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 348 S, 951-952.

Sterling, C., (1970). Crystal-structure of Ruthenium red and
Stereochemistry of its pectic stain. Amer. J. Bot., 57 (2),
172-175.

Summer, J.B. y Howell, S.F., (1935). J, Biol. Chem., 108, 51.

Talmadge, K.W., Keegstra, K., Bauer, W.D. y Albersheim, P.,
(1973(. The structure of plant cell walls.I. The macromole-
cular components of the walls of suspension cultured syca-

more cells with a delayed analysis of the pectic polysaccharides. Plant Physiol., 51, 158-173.

Tandon, R.N. y Chandra, S., (1962). Changes in amino acids, sugars and organic acids in the mycelium of Colletotrichum gloeosporioides Penz. during the autolytic phase of growth. Phyton, 19, 127-132.

Tien, T.M., Dien, H.G., Gaskins, M.H. y Hubbell, D.H., (1981) Polygalacturonic and transeliminase production by Azospirillum species . Can J. Microbiol., 27, 426-431.

Teorell, T. y Stenhagen, E., (1938). Ein universal buffer für den pH bereich 2,0 bis 12,0. Biochem. Z., 299, 416-419.

Tracey, M.V., (1954). Chitin. Modern methods of plant analysis, 2, 264-274.

Tribe, H.T., (1955). Studies in the physiology of parasitism. XIX. On the killing of plant cells by enzymes from Botrytis cinerea and Bacterium aroideum. Ann. Bot., 19, 351-368.

Trinci, A.P.J., Righelato, R.C., (1970). Changes in constituents and ultrastructure of hyphal compartments during autolysis of glucose-starved Penicillium chrysogenum. J. Gen. Microbiol., 60, 239-249.

Tseg, T.C. y Bateman, D.F., (1968). Production of phosphatidases by phytopathogens. Phytopathology, 58, 1437-1438.

Uozumi, T., Takahashi, M. y Arima, K., (1965). Studies on the

autolysis of Aspergillus oryzae . II. Morphological changes of micelia and degradation products of cellular constituents. Agr. Biol. Chem., 29, 1042-1050.

Urbanek, H. y Zalewska-Sobczak, J., (1975). Polygalacturonase of Botrytis cinerea E-200 Pers. Biochim. Biophys. Acta., 377 402-409.

Vasil, I.K., Vasil, V., (1980). Isolation and culture of protoplasts. Internatinal Review of Cytology, Suppl. 11B. Academic Press, Inc.

Vesterberg, O. y Svensson, H., (1966). Iso-electric fractionations, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. Acta Chem. Scand. Ser., 20, 820-834.

Villanueva, J.R., (1966). Protoplasts of fungi. En: The Fungi Ed. G.C. Ainsworth y A.S. Sussman. vol. II, 3-62. Academic Press. London. New York.

Wessels, J.G.H., (1966). Control of cell-wall glucan degradation during development in Schizophyllum commune. Antonie van Leeuwenhoek, 32, 341-355.

Wessels, J.G.H., y Niederpruem, D.J., (1967). Role of a cell-wall glucan-degrading enzyme in mating of Schizophyllum commune. J. Bacteriol., 94, 1594-1602.

Wessels, J.G.H., (1969). A 1,6- β -glucan glucanohydrolase involved in hydrolysis of cell-wall glucan in Schizophyllum commune. Biochim. Biophys. Acta., 178, 191-193.

Wessels, J.G.H., (1971). Cell wall metabolism and morphogenesis in Schizophyllum. En: Recent Advances in Microbiology. Ed. A. Pérez Miravete y D. Pelaez, 141-146. Méjico.

Wessels, J.G.H. y De Vries, O.M.H., (1973). Wall structure, wall degradation, protoplast liberation and wall regeneration in Schizophyllum commune. En: Yeast, Mould and Plant Protoplasts. Ed. J.R. Villanueva, I. García Acha, S. Gascón, y F. Uruburu, 295-306. Academic Press. London. New York.

Wessels, J.G.H. y Marchant, R., (1974). Enzymic degradation of septa in hyphal wall preparations from a monokaryon and a dikaryon of Schizophyllum commune. J. Gen. Microbiol., 83, 359-368.

Wick, R.L. y Schroeder, D.B., (1982). In vitro production of pectolytic and cellulolytic enzymes by Fusarium tricinctum. Mycology, 74, 460-466.

Wood, R.K.S., (1967). Physiol. Plant Pathol. Oxford: Blackwell Scientific Public. Ltd.

Wood, R.K.S., (1973). Specificity in plant disease. En: Fungal pathogenicity and plants response. Ed. R.J.W. Byrde u C. V. Cutting, 1-16. London. Academic Press.

Zalewska-Sobczak, J. y Urbanek, H., (1975). Purification of polygalacturonase produced by Botrytis cinerea E-200. Bulletin de L'academie polanoise des sciences: Serie des sciences biologiques, 23, 663-668.

Zonneveld, B.J.M., (1971). Biochemical analysis of the cell - wall of Aspergillus nidulans. Biochim. Biophys. Acta, 249, 506-514.

Zonneveld, B.J.M., (1972). Morphogenesis in Aspergillus nidulans. The significance of 1,3- α -glucan of the cell-wall and 1,3- α glucanase for cleistotecium development. Biochim. Biophys. Acta, 273, 174-187.

ADDENDA

Albersheim, P. y Killias, V., (1962). Studies Relating to the Purification and Properties of Pectin Transeliminase. Arch. Biochem. Biophys., 97, 107-115.

Bateman, D.F., (1963). The Macerating Enzyme of Rhizoctonia solani . Phytopathology, 53, 1178-1186.

Byrde, R.J.W., (1982). Fungal Pectinases from Ribosome to plant cell wall. Trans. Br. mycol. Soc., 79 (1), 1-14.

Cooper, R.M. Rankin. B. y Wood, R.K.S., (1978). Cel wall-degrading enzymes of vascular wilt fungi. II. Properties and modes of action of polysaccharidases of Verticillium albo-

atrum and Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici. Physil. Plant Pathol., 13, 101-134.

Ferraris, L., Garibaldi, A. y Matta, A., (1974). Polygalacturonase and Polugalacturonate Trans-eliminase Production in vitro and in vivo by Fusarium oxysporum f, sp. lycopersici. Phytopath. Z., 81, 1-14.

Fielding, A.H., (1981). Natural Inhibitors of Fungal Polygalacturonases in Infected Fruit Tissues. J. Gen. Microbiol., 123, 377-381.

Hancock, J.C., Millar, R.L. y Lorbear, J.W., (1964). Role of Pectolytic and Cellulolytic enzymes in Botrytis leaf Beight of onion. Phytopathology, 54, 932-935.

Hancock, J.C., (1968). Degradation of Pectic Substances during Pathogenesis by Fusarium solani f, sp. cucurbitae. Phytopathology, 58, 62-69.

Jermyn, M.A. y Tomkins, R.G., (1950). The Chromatographic Examination of the products of the action of Pectinase on Pectin. Biochem. J., 47, 437-442.

Lahoz, R., Reyes, F. y Martínez, M.J., (1979). Effect on the pH on the degree of autolysis of Aspergillus niger . Can. J. Bot., 57, 1901-1903.

Leal, J.A., Lilly, V.G. y Gallegly, M.E., (1968). The production of indolacetic acid from L-tryptophan by species of Phytophthora . Can. J. Microbiol., 14, 595-600.

Nagel, C.W. y Anderson, M.M., (1965). Action of a Bacterial Transeliminase on Normal and Unsaturated Oligogalacturonic Acids. Arch. Biochem. **Biophys.**, 112, 322-330.

Pettipher, G.L. y Latham, M.L., (1979). Characteristics of Enzymes Produced by Ruminococcus flavefaciens which degrade Plant Cell Walls. J.Gen. Microbiol., 110, 21-27.

Reyes, F, Fernández, C. y Rodríguez, D., (1969). Aislamiento y purificación parcial de enzimas proteolíticas de Pollystictus versicolor. Actas del II congreso Nacional de Microbiología . Madrid. Noviembre 1969.

Reyes, F. Martínez, M.J., Lahoz, R. y Archer, S.A., (1984). Characterization of glycerol as an inhibitor of pectin lyase from autolysing cultures of Botrytis cinerea. Trans. Brith. mycol. Soc. (en prensa).

Wood, R.K.S., (1978). Enzymes produced by fungi and bacteria. Their role in pathogenicity. Ann. Phytopathol., 10, (2), 127-135.